

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Pavel Sojka

Heterologní exprese a izolace lidského cytochromu P450 1B1

Heterologous expression and isolation of human cytochrome P450 1B1

Diplomová práce

školitel: Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informace, zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat mému školiteli Doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za jeho kvalitní vedení mého diplomového projektu, trpělivost, cenné rady a poskytnutou podporu při jeho vypracovávání.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Milichovskému za ochotu a všestrannou pomoc.

V neposlední řadě bych chtěl rovněž poděkovat členům Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí pro práci na tomto diplomovém projektu.

Abstrakt

Cytochromy P450 tvoří superrodinu hemových enzymů, jejíž jednotliví zástupci se vyznačují velmi širokou substrátovou specifitou, tudíž dokáží odbourávat desítky až stovky různých substrátů, avšak s různou účinností a kinetikou. Mezi látky, jež jsou schopni zástupci superrodiny cytochromů P450 odbourávat, patří jak eobiotika, tak xenobiotika. U obratlovců se jedná o membránové enzymy vázané v endoplasmatickém retikulu, které se vyskytují ve zvýšené míře v celé řadě tkání, např. v kůži, ledvinách či plicích. Nejvíce a nejčastěji se ovšem vyskytují v játrech. Cytochrom P450 1B1 je indukibilní enzym, který se vyskytuje převážně v plicích a kůži. Jeho exprese je indukována převážně přítomností polycyklických aromatických uhlovodíků a dioxinů. Mezi xenobiotika degradovaná cytochromem P450 1B1 patří rovněž některé heterocyklické aminy. Enzymy superrodiny cytochromů P450 jsou taktéž zodpovědné za metabolickou aktivaci řady karcinogenů na reaktivní látky, jež participují na vzniku aduktů s DNA a zvyšují hladinu oxidačního stresu v buňce.

Tato diplomová práce se zabývá (i) přípravou dvou forem expresních vektorů kódujících gen lidské formy cytochromu P450 1B1, (ii) heterologní expresí tohoto proteinu, (iii) jeho následnou izolací doplněnou v jednom případě o štěpení TEV proteasou a (iv) porovnáním aktivity získaných preparátů v rekonstituovaném systému v přítomnosti potkaní NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy a fakultativní přítomnosti lidského cytochromu b₅.

Klíčová slova: cytochrom P450 1B1, karcinogeneze, heterologní exprese, izolace, TEV proteasa

Abstract

Cytochromes P450 are heme enzymes with very broad substrate specificity, they can oxidize tens to hundreds of different substrates including both eobiotics and xenobiotics, but with varying efficiencies and kinetics. They are responsible for the metabolic activation of many carcinogens resulting in formation of reactive intermediates, these reactive species participate in the formation of DNA adducts and also increase of oxidative stress. Eukaryotic cytochromes P450 are membrane bound enzymes found mostly in the endoplasmic reticulum. In vertebrates, they are expressed in a variety of tissues mostly in the liver, but also in kidney, lung, skin and others. The cytochrome P450 1B1 is an inducible enzyme which occurs mainly in the lung and skin. Its expression is induced predominantly by the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins and heterocyclic amines. The human cytochromes P450 are typically obtained using heterologous expression and isolated as a C-terminally modified hexa-histaq constructs using immobilized metal affinity chromatography.

This thesis focuses on effect of C-terminal modifications on activity of human cytochrome P450 1B1. First, the two expression vectors encoding the human form of cytochrome P450 1B1 were prepared, one contained a classical C-terminal hexa-histaq modification and second vector histaq that can be removed by a TEV protease. Both forms were produced by the heterologous expression, subsequently isolated and cleaved. Activity of both enzymes was finally evaluated in the reconstituted system in the presence of rat NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase and facultative presence of a human cytochrome b₅.

Key words: cytochrome P450 1B1, carcinogenesis, heterologous expression, isolation, TEV protease

[In Czech]

Obsah

1	ÚVOD.....	10
1.1	BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	10
1.1.1	I. fáze biotransformace.....	12
1.1.2	II. fáze biotransformace.....	13
1.2	MFO SYSTÉM.....	14
1.2.1	Cytochrom <i>b₅</i>	15
1.2.2	NADH:cytochrom <i>b₅</i> oxidoreduktasa.....	16
1.2.3	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa.....	16
1.2.4	Cytochrom P450.....	17
1.2.4.1	Nomenklatura cytochromů P450.....	18
1.2.4.2	Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....	19
1.3	LIDSKÝ CYTOCHROM P450 1B1.....	20
1.3.1	Struktura lidského cytochromu P450 1B1.....	22
1.3.2	Substrátová specifita cytochromu P450 1B1.....	23
1.3.3	Přirozená exprese lidského cytochromu P450 1B1 v organismu.....	24
1.4	HETEROLOGNÍ EXPRESE.....	24
1.4.1	cDNA.....	26
1.4.2	Plasmid pCW.....	26
2	CÍLE.....	28
3	MATERIÁLY A METODY.....	29
3.1	POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	29
3.2	PŘÍSTROJE.....	31
3.3	METODY.....	33
3.3.1	Polymerasová řetězová reakce – PCR.....	33
3.3.2	Purifikace PCR produktu pomocí komerčního kitu.....	35
3.3.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	35
3.3.4	Štěpení DNA restrikčními endonukleasami.....	36
3.3.5	Agarosová elektroforesa.....	37
3.3.6	Izolace DNA z agarosového gelu.....	38
3.3.7	Ligace.....	39
3.3.8	Příprava agarových ploten s antibiotikem.....	40
3.3.9	Výsev buněk na Petriho misky.....	40
3.3.10	Transformace.....	40
3.3.11	Přeočkování vybraných kolonií metodou „single cell“.....	41
3.3.12	Čištění fenolu.....	42
3.3.13	Izolace plasmidu alkalickou lyzí a fenol-chloroformovou extrakcí.....	42
3.3.14	Příprava vzorků pDNA na sekvenační reakci.....	43
3.3.15	Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	44
3.3.16	Kultivace buněk <i>E. coli</i> v menším množství media pro testovací expresi.....	45

3.3.17	Kultivace buněk <i>E.coli</i> ve větším množství media pro velkoexpresi	46
3.3.18	Příprava sferoplastů.....	47
3.3.19	Dezintegrace sferoplastů připravených z buněk <i>E. coli</i>	48
3.3.20	Příprava membránové frakce.....	48
3.3.21	Solubilizace proteinů z bakteriální membrány	49
3.3.22	Izolace a purifikace cytochromu P450 1B1 pomocí afinitní chromatografie	49
3.3.22.1	Štěpení TEV proteasou.....	50
3.3.23	Stanovení celkového proteinu metodou BCA.....	51
3.3.24	Elektroforesa SDS-PAGE.....	51
3.3.25	Příprava TEV proteasy.....	53
3.3.25.1	Produkce TEV proteasy	53
3.3.25.2	Příprava sferoplastů	54
3.3.25.3	Dezintegrace sferoplastů připravených z buněk <i>E. coli</i>	54
3.3.25.4	Izolace TEV proteasy pomocí afinitní chromatografie	55
3.3.26	Příprava rekonstituovaného systému a „markerové“ reakce.....	55
3.3.27	Analýza metabolitů pomocí HPLC na reverzní fázi	56
4	VÝSLEDKY	57
4.1	PŘÍPRAVA TEV PROTEASY	57
4.1.1	Izolace TEV proteasy pomocí afinitní chromatografie	57
4.2	PŘÍPRAVA CYTOCHROMU LIDSKÉHO P450 1B1	58
4.2.1	Charakterizace vektoru	59
4.2.2	Amplifikace a úprava genů pro expresi CYP1B1	60
4.2.3	Vkládání insertu do plasmidu pCW.....	63
4.2.4	Izolace konstruktů 1B1/pCW a jeho ověření	65
4.2.5	Expresce cytochromu P450 1B1 vektorem na bázi pCW	67
4.2.5.1	Testovací exprese	67
4.2.5.2	Expresce proteinů ve větším množství media	69
4.3	IZOLACE LIDSKÉHO CYTOCHROMU P450 1B1	70
4.3.1	Izolace cytochromu P450 1B1 pomocí afinitní chromatografie a jeho purifikace	73
4.3.2	Charakterizace cytochromu P450 1B1	78
4.4	STANOVENÍ METABOLITŮ SUDANU I POMOCÍ HPLC.....	81
5	DISKUSE.....	84
6	ZÁVĚR.....	87
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	89

Seznam zkratek

A _x	absorbance při X nanometrech
ALA	kyselina δ -aminolevulová
APS	peroxodisíran amonný
α -NF	α -naftoflavon
BCA	kyselina bicinchoninová
BIS	N,N-methylen-bisakrylamid
bp	párů bází („Base pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin („Bovine serum albumin“)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP1B1	cytochrom P450, kde „1B1“ označuje rodinu, podrodinu a pořadové číslo enzymu v podrodině
CYP1B1-fw-2-4-del	„primer“ pro „forward“
CYP1B1-his	gen; forma genu CYP1B1 s histidinovou kotvou
CYP1B1-his2	forma genu CYP1B1 s histidinovou kotvou – pro další práci vybrána kolonie „2“
CYP1B1-his2b	forma genu CYP1B1 – pro další práci vybrána kolonie „2“ – po nové transformaci vektorem CYP1B1-his2/pCW vybrána pro další práci kolonie „b“
CYP1B1hm	protein; forma CYP1B1 s histidinovou kotvou
CYP1B1m	protein; forma CYP1B1 po odštěpení histidinové kotvy
CYP1B1-rev-His6	„primer“ pro „reverse“ bez štěpícího místa pro TEV proteasu
CYP1B1-rev-TEVHis6	„primer“ pro „reverse“ se štěpícím místem pro TEV proteasu
CYP1B1-T-his	gen; forma genu CYP1B1 s histidinovou kotvou a štěpícím místem pro TEV proteasu
CYP1B1-T-his2	forma genu CYP1B1 s histidinovou kotvou a štěpícím místem pro TEV proteasu – pro další práci vybrána kolonie „2“
CYP1B1-T-his2c	forma genu CYP1B1 s histidinovou kotvou a štěpícím místem pro TEV proteasu – pro další práci vybrána kolonie „2“ – po nové transformaci vektorem CYP1B1-T-his2/pCW vybrána kolonie „c“

CYP1B1 ^{thm}	protein; forma CYP před odštěpením histidinové kotvy
DLPC	1,2-dilauryl-sn-glycero-3-fosfocholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleotidová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadeninnukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ϵ_{TEV}	absorpční molární koeficient pro TEV proteasu
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
IPTG	isopropyl b-D-1-thiogalaktopyranosid
LB medium	Luria-Brooth medium
MFO system	system se smíšenou funkcí oxidas a oxygenas
mRNA	„messenger“ RNA
mQ	deionizovaná voda
NADH	β -nikotinamid adenin dinukleotid redukovaný
NADPH	β -nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfát redukovaný
Ni-IDA	kyselina iminodiotcová kovalentně navázaná na agarosu imobilizovaná nikellantými kationty
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD ₆₀₀	optická denzita měřená při 600 nm
PCR	polymerasová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
pCW-forw	„primer“ pro „forward“ sekvenaci vektoru na bázi plasmidu pCW
pCW-rev	„primer“ pro „reverse“ sekvenaci vektoru na bázi plasmidu pCW
pDNA	plasmidová DNA
PEG 6000	polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 6000
Pfu polymerasa	DNA polymerasa z bakterie <i>Pyrococcus Furiosus</i>

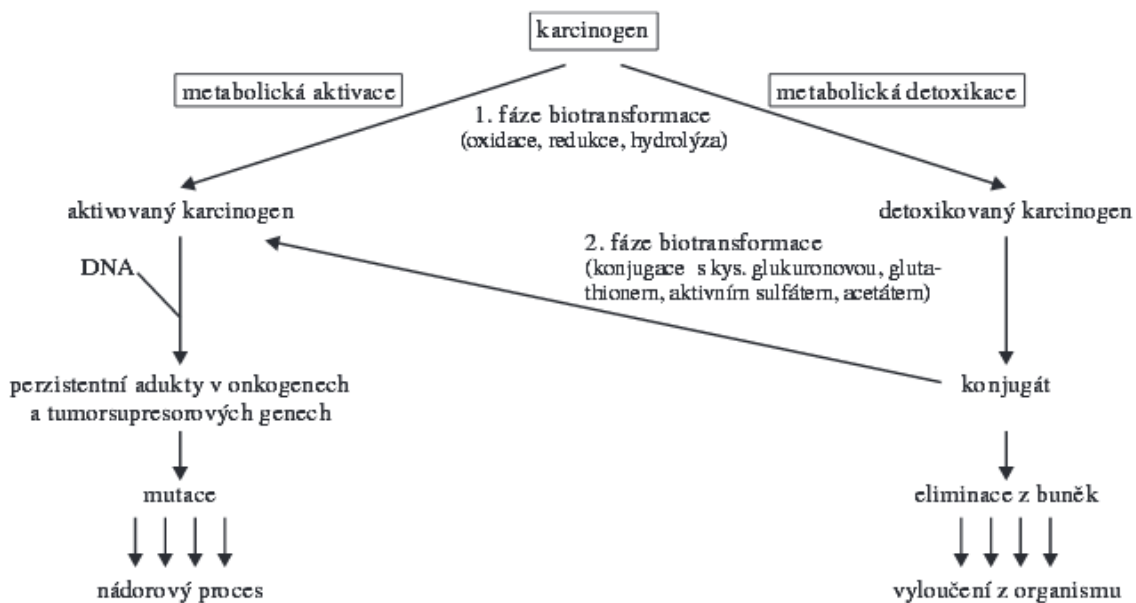
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RH	vodíkový atom vázaný na uhlíku, jenž bude oxidován, kde „R“ značí zbytek molekuly
ROH	hydroxylová skupina vázaná na atomu uhlíku, kde „R“ značí zbytek molekuly
RNA	kyselina ribonukleová
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Sudan I	1-fenylazo-2-naftol
TB medium	Terrific brooth medium
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TEV proteasa	virová proteasa z „tabacco etch virus“
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris/HCl, resp.	Tris ve směsi s kyselinou chlorovodíkovou, resp. octovou
Tris/octan	
Triton X-100	polyethylenglycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenyl ether
UDP	uridindifosfát
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml

1 Úvod

1.1 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé látky neboli xenobiotika jsou látky, s nimiž organismus přichází denně do kontaktu. Tyto látky organismu nepřinášejí žádný energetický profit, neslouží jako stavební materiál a ani nejsou potřebné pro jeho zdravý vývoj [1]. Je proto žádoucí, aby je organismus co možná nejrychleji vyloučil, v případě léků ihned po vykonání svého úkolu v organismu. Soubor mechanismů, které se na vylučování těchto látek podílí, se označuje jako biotransformace [2].

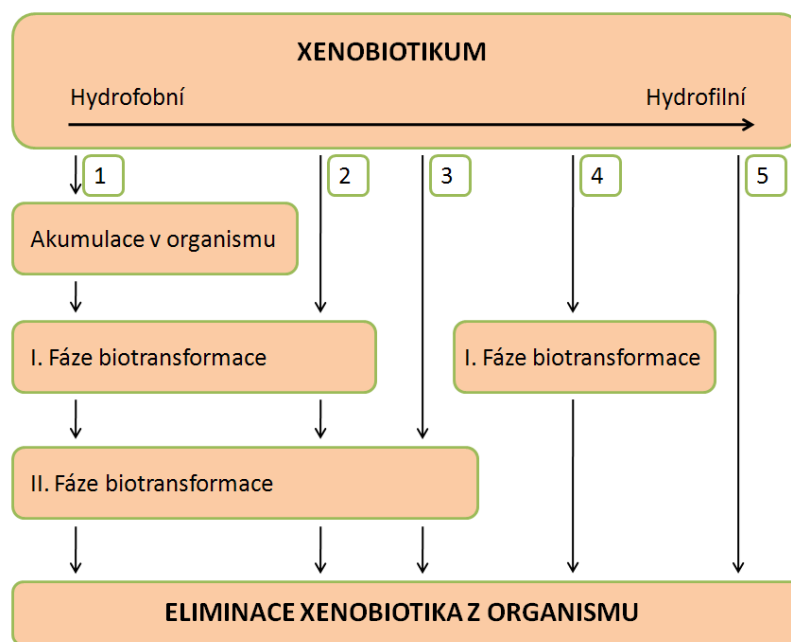
Xenobiotika jsou často nepolárními látkami, které dobře procházejí membránami. Některá z nich jsou vysoce reaktivní, tudíž jsou schopna tvořit kovalentní adukty s DNA. Některá xenobiotika se mohou vázat i na více molekul za vzniku tzv. „cross-linkingu“ (propojení molekul). Může docházet jak k „DNA-DNA cross-linkingu“ (intra i intermolekulárnímu), tak k „DNA-protein cross-linkingu“. Xenobiotika mohou taktéž modifikovat DNA nekovalentními interakcemi, například se vmezeřit mezi páry bazí v DNA dvojšroubovici – interkalovat se. Tyto organismu nevlastní látky se mohou rovněž vázat na proteiny (např. na transkripční faktory či protoonkoproteiny) [3]. Většina xenobiotik však není ve své původní formě dostatečně reaktivní na to, aby mohla samovolně reagovat s DNA nebo proteiny. K jejich aktivaci dochází až v první, případně druhé fázi metabolické přeměny (Obrázek 1). Aktivace xenobiotik způsobuje změnu jejich fyzikálně-chemických vlastností, díky nimž může docházet k výše zmíněným alteracím. Tyto změny mohou následně vést k jednotlivým bodovým mutacím, jenž se mohou kumulovat. Důsledkem jejich kumulace je jak změna struktury DNA, tak produkce proteinů s pozměněnou strukturou a tudíž i funkcí. Všechny tyto faktory vedou ke zvýšenému riziku vzniku nádorového ložiska [4].



Obrázek 1 Schéma metabolické aktivace karcinogenů pomocí biotransformačních reakcí (Převzato z [5]).

Biotransformační enzymy, jejichž substrátová specifita je velice široká [2], se nacházejí u organismů všech vývojových úrovní – nejen eukaryot a prokaryot, ale dokonce také u některých virů [6]. Vlivem evoluce v závislosti na svých životních cyklech a potřebách se sady těchto enzymů u jednotlivých organismů vyvíjely různými směry [7]. Vyšší organismy se snažily xenobiotika ze svého organismu vytěsnit, zatímco nižší organismy se je snažily využívat jako zdroj energie či uhlíku [8].

Vedle metabolismu xenobiotik se biotransformační enzymy podílí také na degradaci eobiotik, jimiž mohou být steroidní sloučeniny, kyselina arachidonová, žlučové kyseliny nebo vitaminy A a D a lipidy [9,10]. Způsob degradace obou typů látek závisí především na jejich povaze. Pokud je látka dostatečně hydrofilní, organismus je schopen ji vyloučit, aniž by musela vstupovat do reakce s enzymy první případně druhé fáze biotransformace. Jak je patrné z Obrázek 2, s klesající hydrofilitou vstupuje xenobiotikum, resp. eobiotikum do biotransformačních reakcí, díky kterým se jeho hydrofilita zvyšuje a usnadňuje se tak jeho exkrece z organismu. K vylučování metabolitů xenobiotik dochází nejčastěji močí a žlučí [3]. Dále pak také dechem či potem. Metabolity xenobiotik se rovněž mohou ukládat do vlasů, nehtů, vousů nebo chlupů [11].



Obrázek 2 Způsoby exkrece cizorodých látek z organismu (Převzato a upraveno z [12]). Xenobiotikum při své exkreci z organismu může v závislosti na své polaritě procházet pouze první (4) či druhou fází biotransformace (3) nebo postupně oběma fázemi (2). V případě xenobiotika ryze hydrofilního charakteru, nemusí do biotransformačních reakcí vstupovat vůbec (5). V případě hydrofobních látek mají tato xenobiotika tendenci ukládat se do tukové tkáně a metabolizovat se o mnoho pomaleji.

Biotransformace xenobiotik u živočichů probíhá ve dvou stupních. Skládá se z derivatizační fáze a konjugací fáze. Při první fázi dochází k zavedení polární části do molekuly nebo k jejímu odkrytí a tak k následnému zvýšení počtu snadno derivatizovatelných funkčních skupin, které zároveň zvýší hydrofilitu molekuly. Při druhé fázi dochází ke konjugaci produktů derivatizační fáze s polárními molekulami. Konjugací fáze má za cíl další prohloubení hydrofility. U rostlin probíhá degradace xenobiotik ve třech fázích. První a druhá probíhají na totožném principu jako u živočichů, ve třetí fázi dochází k opětovné konjugaci [13].

1.1.1 I. fáze biotransformace

U málo hydrofilních látek vstupujících při své degradaci do derivatizační fáze dochází ke zvýšení jejich polarit. Toto zvýšení může probíhat třemi způsoby. Do molekuly je zaveden kyslík nebo molekula ztratí elektrony (S-oxidace, N-oxidace, C-hydroxylace, N-hydroxylace, deaminace, dealkylace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů či dvojných vazeb), nebo se za pomoci hydrolytických reakcí odmaskují polární

funkční skupiny v molekule již přítomné (hydrolysa amidů a esterů). Zvýšení hydrofilicity lze docílit také pomocí redukční reakce na některé z funkčních skupin xenobiotika (redukce nitro- a azoskupin) [14–18].

Mezi hlavní oxidační systémy patří MFO systém (kapitola 1.2), resp. systém oxygenas se smíšenou funkcí. Další enzymy podílející se na biotransformaci oxidační cestou jsou flavinové monooxygenasy (Zieglerovy enzymy). Tyto enzymy zavádějí do molekuly xenobiotika jeden atom kyslíku z jeho biatomické molekuly, druhý atom je navázán na hydroxylovou skupinu za vzniku vody. Dioxygenasy, mezi které patří například fenantrendioxygenasa, naftalendioxygenasa, zavádí do molekuly xenobiotika oba atomy molekuly kyslíku, nevzniká tedy voda. Tyto enzymy mají široké zastoupení mezi mikroorganismy, které využívají těchto enzymů k degradaci látek obsahujících alespoň jeden aromatický kruh [19]. Xenobiotika, která v derivatizační fázi podléhají oxidační cestě jsou například elipticin [20], benzo(a)pyren [21], ethanol [22], 17 β -estradiol [23], Sudan I [24]. Dalšími oxidačními enzymy jsou peroxidasy [13], katalasy, alkoholdehydrogenasa nebo superoxiddismutasa.

Redukčními enzymy derivatizační fáze jsou cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytosolární xanthinoxidasa, DT-diaforasa a aldehydoxidasa. Xenobiotika, na jejichž derivatizační fázi biotransformace participují redukční enzymy jsou 1-nitropyren a 2-nitroanisol [5,25].

1.1.2 II. fáze biotransformace

Ve druhé fázi biotransformace, zvané také konjugací, dochází, jak již název napovídá, ke konjugaci vstupujících molekul xenobiotika s polárními látkami s nízkou molekulovou hmotností. To se děje na polární skupině v molekule xenobiotika již přítomné nebo zavedené v první fázi biotransformace. Mezi nejdůležitější reakce patří konjugace s aktivním sulfátem, kyselinou glukuronovou, acetátem a aminokyselinami nebo peptidy (taurin, glycin, alanin, cystein, glutathion) [14].

Největší procento konjugáčnických reakcí bývá katalyzováno UDP-glukuronyltransferasou. Ta je v reakcích donorem kyseliny glukuronové v podobě UDP-glukuronové kyseliny. Vzniklé konjugáty (ať už O-glukosiduronáty či N-glukosiduronáty) jsou z těla vylučovány převážně močí [26].

Neméně významnou konjugací xenobiotik je konjugace s glutathionem, která je zprostředkována glutathiontransferasou. Tento enzym se vyskytuje v mnoha buněčných kompartmentech, např. v mitochondriích nebo v endoplasmatickém retikulu i v cytoplasmě. Vzniklý konjugát xenobiotika s glutathionem z organismu není vyloučen, jako tomu je např. u konjugátů s kyselinou glukuronovou, ale je dále štěpen pomocí peptidas (u rostlin ke štěpení glutathionu nedochází). Po odštěpení γ -glutamylového a glycinového zbytku konjugované molekuly glutathionu dochází k acylaci cysteinového zbytku za vzniku N-acetylcysteinového konjugátu (merkapturové kyseliny), který je následně z organismu vyloučen močí. Obdobným způsobem probíhá taktéž konjugace s cysteinem [27].

1.2 MFO systém

Nejvýznamnější enzymový systém první fáze biotransformace je mikrosomální monooxygenasový systém, známý také jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“ systém – MFO systém). Tímto systémem jsou katalyzovány jak reakce oxidační, tak i redukční, přičemž je spotřebována jedna molekula kyslíku [28].

Systém se nachází na vnější membráně hrubého i hladkého endoplasmatického retikula v orgánech, které jsou nejvíce exponovány xenobiotikům. Těmi jsou hlavně kůže, dýchací systém, játra, ledviny a gastrointestinální trakt. Dále je přítomen také na vnitřní membráně mitochondrií, hlavně v kůře nadledvinek, kde katalyzuje degradaci eobiotik, kterými mohou být vitaminy, látky steroidní povahy, mastné kyseliny nebo žlučové kyseliny [28–30].

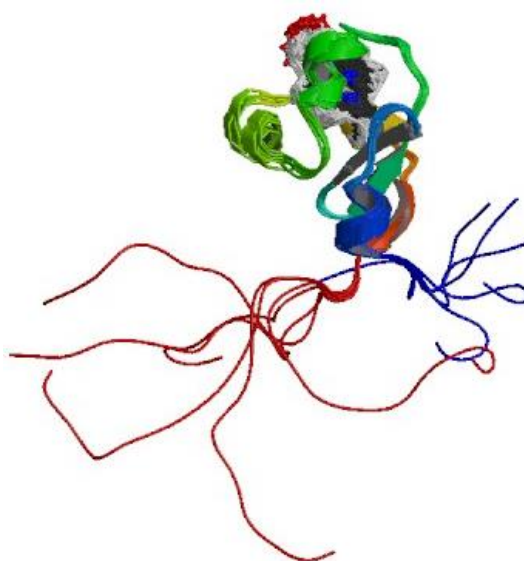
Multienzymový komplex oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí se sestává z biologické membrány, která má zásadní význam na vzájemném postavení enzymů, jež jsou do ní zabudovány, tudíž i na funkci celého MFO systému. Do membrány endoplasmatického retikula jsou inkorporovány hemoprotein cytochrom b_5 (kapitola 1.2.1), flavoproteinové enzymy NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasa (kapitola 1.2.2) a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (kapitola 1.2.3) a hemthiolátový enzym cytochrom P450 (kapitola 1.2.4), jenž má v celém systému funkci terminální oxidasy. Narozdíl od vyšších živočichů je MFO systém u bakterií lokalizován ve své solubilní formě volně v cytoplasmě [31].

1.2.1 Cytochrom b₅

Tento malý protein kyselého charakteru, známý již od 50. let 20. století, o velikosti 16,7 kDa je dnes známý ve třech savčích formách [32–34]. Ve své molekule obsahuje protoporfyrin IX (hem b), který je jeho prosthetickou skupinou [35]. Cytochrom b₅ (Obrázek 3) se proto řadí do skupiny hemových enzymů.

Mezi fyziologické funkce mitochondriálního cytochromu b₅ patří degradace oebiotik a hormonů mužských gonád [36]. Erytrocytární forma participuje zejména na redukci methemoglobinu [37] a mikrosomální na syntéze cholesterolu, plasmalogenu a desaturaci mastných kyselin [34,38–40].

V MFO systému zastává především funkci přenosu elektronů mezi NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasou, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou a cytochromem P450, který je pomocí interakce s cytochromem b₅ stimulován k hydroxylačním reakcím. Dále se také podílí na druhé redukci atomu železa v reakčním centru cytochromu P450 při oxygenasové reakci. Elektron pro první redukci atomu železa ovšem snáze přechází z NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy [41,42].



Obrázek 3 Struktura cytochromu b₅ získaná pomocí NMR. Převzato z [43].

Struktura cytochromu b₅ je tvořena šesti α helixy a pěti β skládanými listy. Do membrány je protein zanořen enzymově neaktivní C-koncovou, hydrofobní doménou. N-koncová, enzymově aktivní, doména se nachází mimo membránu [32].

1.2.2 NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasa

Cytochrom b₅ oxidoreduktasa (EC: 1.6.2.2) je membránový protein tvořený jednou doménou o molekulové hmotnosti 33,1 kDa. Jelikož ve své molekule obsahuje jako kofaktor FAD (Obrázek 4), řadí se tento enzym do rodiny flavinových enzymů [44,45].

V organismu se tento enzym podílí na desaturaci a elongaci mastných kyselin a na biosyntéze cholesterolu. V erytrocytech pak solubilní forma tohoto enzymu participuje na redukci methemoglobinu. V MFO systému je odpovědný za přenos elektronů z NADH na cytochrom b₅ [44].



Obrázek 4 Krystal lidského NADH:cytochromu b₅ oxidoreduktasy získaný pomocí rentgenové krystalografie s rozlišením 0,078 nm. Převzato z [44].

1.2.3 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

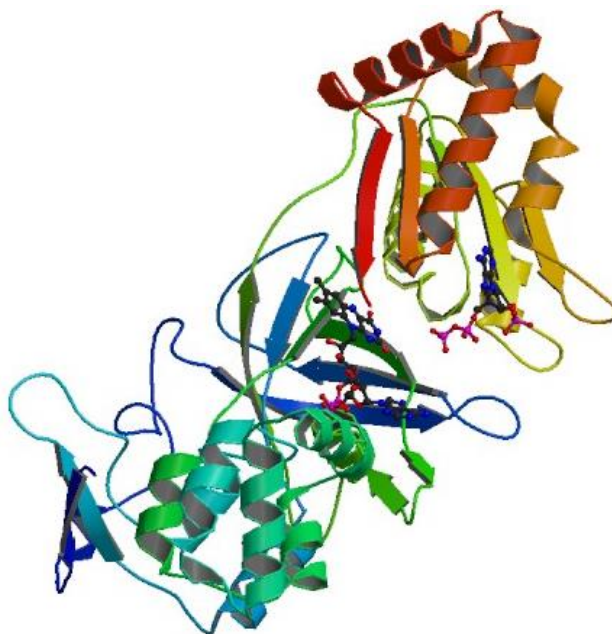
NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (EC: 1.6.2.4) je membránový protein žluté barvy s molekulovou hmotností 78 kDa (Obrázek 5). Poprvé byl izolován v roce 1940, avšak jeho účast v MFO systému jako reduktasy cytochromu P450 byla objevena až roku 1968 [46,47].

Je složený ze dvou funkčních domén. První, hydrofobní N-terminální doména (6 kDa) je zakotvena v membráně. Druhá, hydrofilní C-terminální doména má katalytickou

funkci. Jeho hydrofilní doména obsahuje ve svém aktivním centru dva flavinové kofaktory, tento protein tedy patří do malé rodiny diflavinových oxidoreduktas [48,49].

V organismu tento enzym zastává funkci přenašeče elektronů. V MFO systému, kde plní funkci děliče elektronového páru mezi svými kofaktory, přenáší elektrony z NADPH až na cytochrom P450. Důsledkem těchto elektronových transferů je první a následně druhá redukce atomu železa v aktivním centru cytochromu P450. Jak již bylo řečeno v kapitole 1.2.1, na druhé redukci fakultativně participuje také cytochrom b_5 [50].

Přenos elektronů byl ale popsán také například na cytochrom b_5 , cytochrom c, hem oxygenasu, elongasu mastných kyselin a další látky. Participuje tak na celé řadě metabolických pochodů [51,52].



Obrázek 5 Schematické znázornění struktury FAD/FMN domény lidské NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy získané pomocí rentgenové krystalografie s rozlišením 0,14 nm. Převzato z [53].

1.2.4 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (EC: 1.14.14.1) jsou enzymová rodina membránových proteinů nacházejících se v systému oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí, kde plní roli terminální oxidasy. Poprvé byly objeveny v jaterních mikrosomech králíka při zkoumání vlivu sympatomimetických aminů na kardiovaskulární systém v roce 1953. V tomtéž roce bylo také zjištěno, že k degradaci xenobiotik cytochromy P450 je zapotřebí NADPH a

molekulární kyslík [54,55]. V roce 1958 byl detekován Sorretův absorpční pás v oblasti 450 nm způsobený absorpcí komplexu cytochromu P450 s molekulou oxidu uhelnatého [56,57]. Tento fakt ukazoval na přítomnost hemu b v molekule, která byla v roce 1964 pojmenována jako cytochrom P450 [58,59].

Cytochrom P450, jehož krystalová struktura byla známa jako první, nese označení CYP_{cam} (CYP101) a pochází z bakterie *Pseudomonas Putida*, bakterie využívající kafr jako zdroj uhlíku [60,61]. Tato krystalová struktura s rozlišením 0,26 nm byla objasněna v roce 1985. Následovalo objasnění dalších krystalových struktur bakteriálních cytochromů P450, konkrétně CYP_{terp} (CYP108) [62] a CYP_{BM3} (CYP21B3) [63], a posléze i cytochromů zabudovaných v membráně.

1.2.4.1 Nomenklatura cytochromů P450

Název enzymu – cytochrom má svůj původ v řečtině. Je složen ze slova „cyto“ – buňka (označení lokalizace proteinu) a ze slova „chrome“ – barva (označení fotochemické vlastnosti proteinu). Značení P450 je odvozeno od slova „pigment“ a číslo „450“ udává vlnovou délku v nanometrech, při které tento redukovaný enzym s navázanou molekulou oxidu uhelnatého vykazuje při absorpci světelného záření své maximum [58].

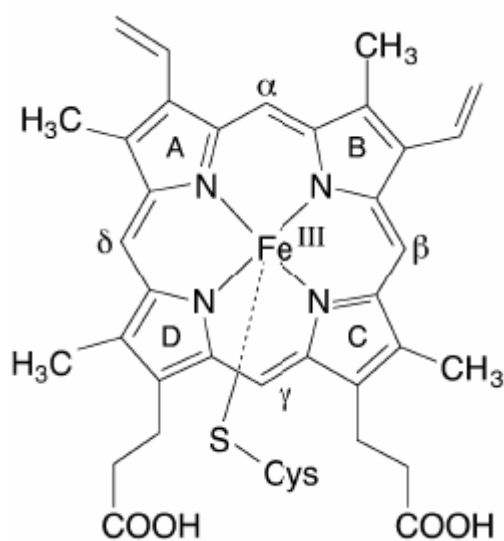
Nomenklatura cytochromů P450 byla dlouho nejednotná. Nezávisle na sobě se používalo mnoho jednotlivých nomenklatur. Některé typy proteinů měly i více jmen. Pro sjednocení nomenklatury byla proto v polovině osmdesátých let minulého století sestavena Komise pro standardizovanou nomenklaturu eukaryotických cytochromů P450 [64,65].

Nomenklatura cytochromů P450 byla založena na srovnávání aminokyselinových sekvencí těchto proteinů. Díky této metodě byla superrodina cytochromů P450 rozdělena do rodin a podrodin dle následujících pravidel, stanovených komisí [64,65].

- Z názvu cytochrom P450 bude vytvořena zkratka „CYP“.
- Proteiny s homologií primární struktury vyšší než 40% budou zařazeny do jedné rodiny, která bude označena arabským číslem (CYP1).
- Proteiny s homologií primární struktury vyšší než 55% budou zařazeny do jedné rodiny, která bude označena velkým písmenem (CYP1A).
- Jednotliví zástupci rodin budou po zařazení do příslušné podrodiny označeni pořadovým číslem (CYP1A1).

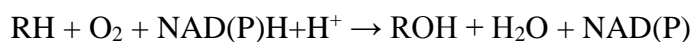
1.2.4.2 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Terminální fáze monooxygenasové reakce MFO systému je založena na hemthiolátovém enzymu ze superrodiny cytochromů P450. Tyto proteiny obsahují ve svém aktivním centru molekulu hemu b (protoporfyrinu IX) (Obrázek 6). Prosthetická skupina hemu b je v aktivním centru vázána přes cystein (v případě lidského cytochromu P450 1B1 se jedná o C470), jenž plní funkci pátého ligandu a který je po navázání molekuly oxidu uhelnatého do aktivního centra enzymu – jako šestého ligandu rovněž zodpovědný za posun absorpčního maxima cytochromu P450 do oblasti 450 nm [65–67].



Obrázek 6 Molekula hemu b (protoporfyrin IX) nacházející se v aktivním centru cytochromu P450, na které je vázána přes cysteinovou síru. Převzato z [68].

Do terminální oxidace vstupuje jako jeden ze substrátů biatomická molekula kyslíku. Do molekuly xenobiotika – druhého substrátu je ovšem zabudován pouze jeden atom kyslíku. Reakce je proto řazena mezi monooxygenasové. Třetí substrát této reakce je NADPH, který redukuje atom železa v aktivním centru [68]. Celé schéma terminální oxidace lze shrnout rovnicí1.

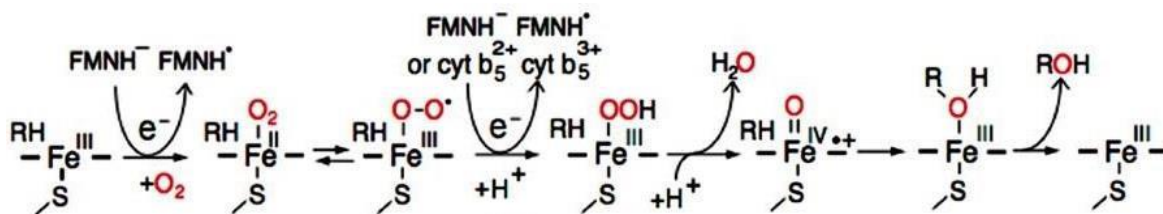


Rovnice1 Sumarizovaný zápis terminální fáze reakce MFO systému.

V relaxovaném stavu, kdy je šestým ligandem na molekule hemu b v reakčním centru voda, je protein v nízkospinové (hexakoordinované) ferri-formě [69]. V této fázi

dochází k vytlačení vody z aktivního centra substrátem a následně k jeho navázání do aktivního centra namísto vody. Po navázání substrátu se nízkospinová ferri-forma změní ve vysokospinovou (pentakoordinovanou) formu, která má vyšší záporný potenciál. Díky této změně dále dochází k první redukci atomu železa NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou na ferro-formu. Nyní je aktivní centrum schopné vázat biatomickou molekulu kyslíku či peroxidu, případně oxidu uhelnatého, který zde má proti kyslíku přibližně 1000 krát vyšší afinitu [68,70].

V důsledku navázání molekuly kyslíku dochází ke změně spinového stavu atomu železa, což zapříčiňuje přechod komplexu na ferri-peroxo formu. Dále dochází k redukci druhým elektronem, jenž může pocházet jak od NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, tak od NADH:cytochromem b₅ oxidoreduktasy, a k okamžité protonaci za vzniku ferri-hydroperoxo formy. Vlivem další protonace dochází k hydrolýze vazby mezi atomy kyslíku. Z reakčního centra se uvolní molekula vody a vzniká ferrioxenový komplex, který je díky své reaktivitě schopen zabudovat do molekuly xenobiotika atom kyslíku. Z reakčního centra se uvolní produkt reakce a železo se vrací zpět do svého výchozího stavu [68,70]. Celé toto schéma je znázorněno na Obrázek 7.

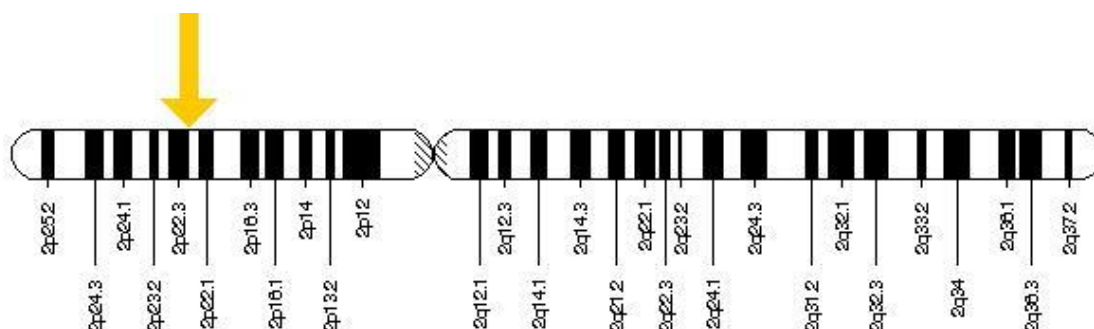


Obrázek 7 Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato z [70].

1.3 Lidský cytochrom P450 1B1

První zmínka o cytochromu P450 1B1 pochází z roku 1991, kdy byla v buněčné linii lidských keratinocytů objevena DNA kódující dosud neznámý protein. Později bylo ověřeno, že tento dosud nepopsaný úsek DNA se v lidských keratinocytech objevil v reakci na přítomnost dioxinu (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin, TCDD) [71]. Další pokusy s buněčnými liniemi lidských keratinocytů byly cíleně mířeny na získání co možná největšího množství mRNA za účelem zjištění otevřeného čtecího rámce genu a predikce délky proteinu, přípravy cDNA a bližší charakterizace kódu. Tyto charakterizace byly prováděny pomocí elektroforesy a počítačové analýzy sekvence [72].

Bylo zjištěno, že genetická informace kódující lidský cytochrom P450 1B1 se nachází na kratším rameni druhého chromosomu mezi páry bazí 38 294 745 a 38 303 322 (Obrázek 8) [73]. Celková délka genu je 8577, avšak jeho otevřený čtecí rámec začíná až na druhém exonu. Gen obsahuje tři exony a dva introny. V genu není přítomen konsenzuální TATA box, nicméně jeho přepis je pod kontrolou dioxin-responsivního enhanceru. Délka překládané části genu je 1629 bp [74].



Obrázek 8 Gen kódující lidský cytochrom P450 1B1 se nachází na kratším rameni druhého chromosomu na pozici 22.2 [73].

Gen kódující cytochrom P450 se vyskytuje v dosud 31 známých alelách [75]. Nativní forma CYP1B1 se skládá z 543 aminokyselin [72]. Tento hemthiolátový enzym hraje důležitou roli v degradaci xenobiotik a eobiotik v reakcích první fáze biotransformace. Participuje rovněž na biosyntéze endogenních sloučenin mezi něž patří steroidní hormony, žlučové kyseliny nebo cholesterol [76].

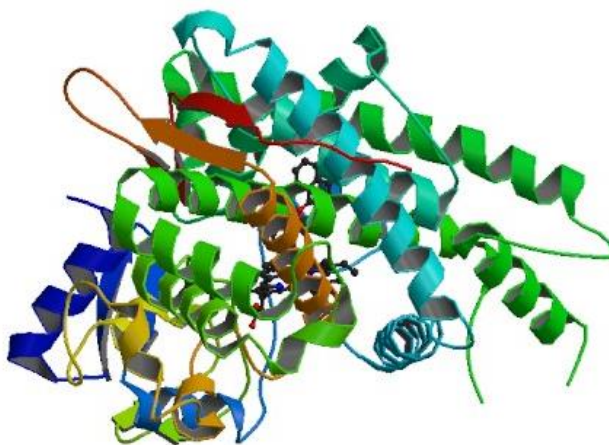
Vedle arylového uhlovodíkového receptoru je exprese cytochromu P450 1B1 podmíněně regulována také estrogenovým receptorem a cAMP responsivním elementem. Bylo prokázáno, že transkripční faktor – 17 β -estradiol je CYP1B1 hydroxylován v poloze 4, díky čemuž se stává aktivovaným karcinogenem. Připočteme-li k této skutečnosti fakt, že cytochrom P450 1B1 byl ve zvýšené míře objeven v nádorových buňkách prsu, prostaty, vaječníků, plic nebo mozku, bylo navrženo, že selektivní inhibitor toho enzymu by mohl výskytu nádoru v těchto tkáních předcházet. Další alternativou by bylo připravit léčivo, jež by bylo aktivovatelné právě cytochromem P450 1B1 a které by po své aktivaci dokázalo nádorové buňky úspěšně usmrtit [76].

Na počátku 90. let 20. století se spekulovalo, že cytochrom P450 1B1 se podílí na růstu a diferenciaci [77]. Byla pozorována přímá úměra mezi výskytem primárního kongenitálního glaukomu (PKG) a přítomností zkrácené mutantní alely CYP1B1 s absencí

funkční formy tohoto genu [78]. Tato pozorování vedla ke teorii, že CYP1B1, který je vyžadován pro normální vývoj trabekulární sítě, by mohl sloučeniny nebo intermediáty potřebné k diferenciaci metabolizovat za vzniku dvou odlišných produktů. Korelace mezi PKG a poškozeným genem CYP1B1 byla potvrzena u Marokánců [79], Francouzů [80], Číňanů [81], Pákistánců [82] i Slovenských Romů [83].

1.3.1 Struktura lidského cytochromu P450 1B1

Struktura lidského cytochromu P450 1B1 byla určena pomocí rentgenové krystalografie s rozlišením 0,27 nm (Obrázek 9). Krystal, jenž byl touto metodou analyzován, měl kvůli snadnější krystalizaci ve svém aktivním místě vázán svůj inhibitor – α -naftoflavon [76].



Obrázek 9 Krystal lidského cytochromu P450 1B1 v komplexu s α -naftoflavonem získaný pomocí rentgenové krystalografie s rozlišením 0,27 nm. Převzato z [84].

Porovnáme-li primární strukturu cytochromu P450 1B1, jediného zástupce 1B podrodiny, s oběma zástupci 1A podrodiny, zjistíme, že se jejich primární struktura značně liší. Konkrétně 38, resp. 36% shodou v identitě aminokyselinových sekvencí mezi CYP1B1 a CYP1A1, resp. CYP1A2. I přes tato odlišení zůstala struktura aktivních center u všech tří terminálních oxidas MFO systému rodiny 1 konzervativní. Nejen u člověka, ale i napříč většinou druhů obratlovců. Konzervativní aktivní centrum se ale v obou podrodinách liší svou orientací, což je způsobeno přibližně třetinovou identitou aminokyselinových sekvencí mezi oběma podrodinami [76].

Porovnáním orientace aktivních center u CYP1A2 a CYP1B1 zjistíme, že oba enzymy přijímají relativně ploché substráty helixem I a jsou charakterizovány distorzí helixu F v místech Phe231 u CYP1B1, resp. Phe226 u CYP1A2 a tedy podobnou pozicí π - π interakce s α -NF, který je u CYP1A2 tudíž vázán v mírně odlišné orientaci než u CYP1B1. Odlišná vazba α -NF v reakčních centrech obou enzymů tak z části odráží odlišnou konformaci B'-C vlásenky, která je v obou enzymech stabilizována mírně odlišnými vodíkovými vazbami [76].

Zjištění o podobnosti aktivních center obou podrodin rodiny 1 tak zdůvodňuje výrazný překryv množin substrátů jednotlivých zástupců cytochromů P450 rodiny 1 [76].

1.3.2 Substrátová specifita cytochromu P450 1B1

Ačkoli je cytochrom P450 1B1 jediným zástupcem svojí podrodiny, jeho substrátová specifita se do značné míry překrývá s ostatními členy cytochromů P450 rodiny 1 [85]. Tato skutečnost pramení z vysoké podobnosti reakčního centra CYP1B1 a ostatních zástupců rodiny 1, jmenovitě CYP1A1 a CYP1A2, jak je vysvětleno v kapitole 1.3.1. Rozsah substrátové specifity CYP1B1 se rovněž překrývá i s dalšími rodinami, konkrétně s rodinami 2, 3 a 4. Tyto enzymy se spolu s enzymy rodiny 1 podílí na první fázi transformace většiny xenobiotik i eobiotik přítomných v organismu. Překryv substrátové specifity cytochromu P450 1B1 a jednotlivých zástupců 2., 3. a 4. rodiny již přirozeně není tak markatní, jako tomu bylo u podrodiny 1A. Tato skutečnost ovšem přirozeně vyplývá z faktu, že se jedná o dvě rozdílné rodiny [76].

Cytochrom P450 1B1 obecně metabolizuje lipofilní endogenní látky a xenobiotika. Mezi substráty, jenž cytochrom P450 1B1 metabolizuje patří např. heterocyklické aminy a arylaminy [86], rutakarpin [87], retinoidy, kyselina arachidonová [88], melatonin [76] či 7-ethoxyresorufin [89]. Stejně substráty je schopen metabolizovat rovněž CYP1A1. Signifikantní rozdíl mezi oběma terminálními oxidasami ale nastává při degradaci 17 β -estradiolu. Na rozdíl od cytochromu P450 1A1, který tento endogenní hormon hydroxyluje v poloze 2, a mnoha dalších cytochromů (1A a 3A podrodiny) se regioselektivita této hydroxylace u cytochromu P450 1B1 liší. 17 β -estradiol je hydroxylován cytochromem P450 1B1 v poloze 4. Touto pro CYP1B1 specifickou reakcí je 17 β -estradiol aktivován na karcinogenní induktor [90].

Cytochromy P450 1B1 a 1A1 mají vedle mnoha substrátů, jenž jsou schopny metabolizovat, společně také několik inhibitorů, mezi které patří např. α -naftoflavin. Tento inhibitor ovšem daleko lépe inhibuje CYP1A2 [91].

1.3.3 Přírozená exprese lidského cytochromu P450 1B1 v organismu

Cytochrom P450 1B1 je inducibilní enzym, který je za normálních okolností přítomen v mnoha typech tkání, avšak v nízké koncentraci [72]. K transkripci genu, kterým je kódován, dochází pomocí aktivace arylového uhlovodíkového receptoru. Transkripčními faktory, jimiž je tento receptor aktivován, jsou planární molekuly polyaromatických uhlovodíků a jejich deriváty, jak je patrné z již názvu receptoru. Vedle CYP1B1 jsou stejnými transkripčními faktory aktivovány také CYP1A1 a CYP1A2. Zatímco cytochromy, jež mají ve svých podrodinách pořadové číslo 1, jsou exprimovány převážně extrahepatálně, hlavním místem exprese cytochromu P450 1A2 jsou játra [76]. Orgány přirozené exprese cytochromu P450 1B1 jsou hlavně plíce a kůže. Nalezen byl rovněž ve slezině, prostatě, děloze, prsních žlázách či placentě [72,92,93]. U cytochromu P450 1A1 jsou místa výskytu podobná jako u enzymu CYP1B1. Byl nalezen v plicích, kůži, ledvinách, placentě, mozku a tenkém střevě [94,95].

1.4 Heterologní exprese

Heterologní exprese je expresní metoda pro přípravu rekombinantních proteinů. Tato metoda využívá pro expresi těchto proteinů organismy, v jejichž genomu se genetická informace, na základě jejíž předlohy je přeložen výsledný rekombinantní protein, přirozeně nevyskytuje. Hostitelskými organismy používanými pro heterologní expresi mohou být jak prokaryota [90], tak eukaryota. Mezi eukaryotní expresní systémy patří buňky kvasinek [96], hmyzí buňky [97], savčí buňky [98] i transgenní rostlinné buňky [99]. Exprese v eukaryotických buňkách je ovšem finančně a časově nákladná. V praxi se proto používají hlavně prokaryotní organismy, které mají oproti eukaryotním expresním systémům, zvláště pak těm vyšším, řadu nevýhod. Mezi jejich největší nevýhody patří například neschopnost prokaryot glykosylovat rekombinantní protein nebo ho jinak posttranslačně modifikovat. Celkové porovnání expresních systémů je shrnuto v Tabulka 1 [100].

Tabulka 1 Klady a zápory expresních systémů. Převzato ze [100].

Charakteristika	<i>E. coli</i>	kvasinky	hmyzí buňky	savčí buňky
Buněčný růst	rapidní (30min)	rapidní (90min)	pomalý (18-24hod)	pomalý (24hod)
Požadavky na růstové medium	minimální	minimální	komplexní medium	komplexní medium
Cena růstového media	nízká	nízká	vysoká	vysoká
Množství exprimovaného proteinu	velké	malé až velké	malé až velké	malé nebo střední
Extracelulární exprese	sekrece do inkluzních tělísek	sekrece do media	sekrece do media	sekrece do media
Skládání proteinu	obvykle nutné dodatečné složení	v některých případech nutné dodatečné složení	řádné složené proteiny	řádné složené proteiny
Posttranslační modifikace				
N-glykosylace	-	vysoký obsah manosy	jednoduché, bez sialové kyseliny	+
O-glykosylace	-	+	+	+
fosforylace	-	+	+	+
acetylace	-	+	+	+
acylace	-	+	+	+
χ -karboxylace	-	-	-	+

Vedle problémů s postranslačními modifikacemi u expresí v prokaryotních organismech se u nich rovněž objevují problémy při nadprodukci exprimovaného proteinu a jeho správném složení. I z těchto a dalších důvodů se při přípravě některých terapeutických proteinů používá savčí expresní systém [98,101].

Nejhojněji využívaným expresním systémem je gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, jejíž genom obsahuje 4,6 milionu párů bazí. Laboratorně využívané kmeny *E. coli* byly připraveny na bázi kmene K-12, jenž byl prvně získán v roce 1922 [102]. Z něj odvozený kmen DH5 α , používaný v této práci, byl poprvé připraven v roce 1985 v laboratoři Douglase Hanahana, podle kterého byl i pojmenován [103].

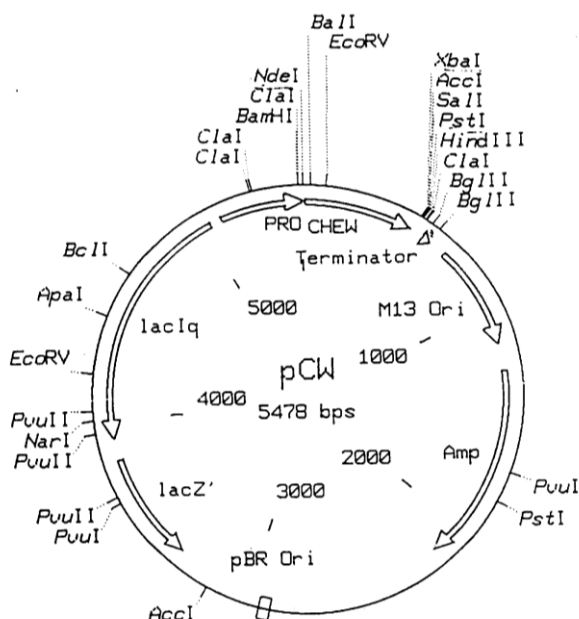
1.4.1 cDNA

Komplementární DNA nebo-li cDNA (z angl. „complementary DNA“) je úsek DNA vzniklý z mRNA (po odstranění intronů) jejím přepisem. Přepis je katalyzován reverzní transkriptasou, která se přirozeně vyskytuje v retrovirech. Reverzní transkriptasa nasedne na 3'-konec mRNA prodloužený o polyadenylovaný úsek sloužící jako její „primer“. Polyadenylovaný úsek na 3'- konci spolu s guaninovou čepičkou na 5'- konci jsou získány potranskripční úpravou. Vzniklá RNA/DNA dvojšroubovice je štěpena v alkalickém prostředí RNAsou H, k DNA vláknu je pak následně pomocí DNA polymerasy dosyntetisována jeho komplementární část [104].

cDNA, která často obsahuje expresní označení – tzv. „tagy“, je používána pro klonování genů, jako genová sonda nebo při tvorbě cDNA knihoven. Její výhodou, že v ní nejsou nepřítomny introny, tudíž se s ní lehce pracuje [105].

1.4.2 Plasmid pCW

Plasmid pCW je expresní vektor, nesoucí rezistenci na antibiotikum ampicilin, jenž je často používaný při expresích cytochromů P450 v *E. coli* [106]. Byl vytvořen při interakčních studiích mezi signálními proteiny CheA a CheW. Pro expresi těchto signálních proteinů byl připraven konstrukt na bázi pHSE5, do kterého byla vložena cDNA proteinu CheW o velikosti 500 párů bazí za vzniku plasmidu pCW (odtud pramení také název plasmidu pCW) o velikosti 5487 párů bazí [107,108]. Mapa plasmidu pCW je znázorněna na Obrázek 10 na následující straně.



Obrázek 10 Mapa plasmidu pCW. Převzato ze [107].

Expres v tomto plasmidu je plně pod kontrolou *tac* promotorů (složeného z *tacI* a *tacII*). Jejich funkce je potlačována *lac* represorem, který je aktivovatelný laktosou nebo jejími analogy, např. IPTG [109].

Úsek označený *lacIq* kóduje gen pro laktosový represor *lacI*, který se v metabolismu podílí na odbourávání laktosy, resp. alolaktosy. Pokud není přítomna laktosa ani alolaktosa, represor brání expresi rekombinantního proteinu – má represní účinek. Mechanismus exprese rekombinantního proteinu tví ve vazbě laktosového represoru na DNA v místě *lac* promotoru. IPTG dokáže nahradit roli laktosy, tudíž se na receptor váže lépe než represor a indukuje tak expresi rekombinantního proteinu. Ačkoli je z finančního hlediska přijatelnější laktosa, v praxi se používá IPTG. Ten je díky přítomnosti thioeterové vazby ve své molekule prakticky nedegradovatelný β -galaktosidasou. V buněčné kultuře tak zůstává stále konstantní množství induktoru, který může mít vliv na expresi rekombinantního proteinu [110,111].

2 Cíle

Primárním cílem této diplomové práce bylo ověření vlivu histidinové kotvy na aktivitu lidského cytochromu P450 1B1 v rekonstituovaném systému za přítomnosti potkaního NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasy a fakultativní přítomnosti lidského cytochromu b₅. Těchto reakcí se využívá pro metabolické studie *in vitro* a studium vlivu vzájemných interakcí mezi jednotlivými enzymy na funkci celého systému.

Mezi dílčí cíle této práce patřilo připravit dvě formy expresních vektorů, založených na plasmidu pCW, kódující lidskou formu cytochromu P450 1B1 s klasickou C-terminální histidinovou kotvou a také s odštěpitelnou histidinovou kotvou. Dalšími cíli této práce bylo zvolit vhodný bakteriální kmen pro heterologní expresi a získat tak dostatečné množství aktivního enzymu. Ten následně izolovat a v jednom případě rovněž štěpit za pomoci TEV proteasy a porovnat enzymové aktivity obou studovaných forem enzymu.

3 Materiály a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Alchimika, ČR: CHAPS.

Eastport, ČR: Primery pro PCR, primery pro sekvenaci konstruktů na bázi pCW.

Erba Lachema, ČR: EDTA, sacharosa, bromfenolová modř, kyselina chlorovodíková, chloroform, octan amonný, glukosa, isopropanol, síran nikelnatý, hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný dekahydrát, vinan sodný, síran měďnatý pentahydrát, isoamylalkohol, peroxodisíran amonný (APS), 1-fenylazo-2-naftol (Sudan I).

Fermentas, Kanada: 2-Log DNA marker, Pfu DNA polymerasa, pufr pro Pfu DNA polymerasu, síran hořečnatý (25 mmol/l).

Fuka, Švýcarsko: Methanol, 2-merkптоethanol, tris(hydroxymethyl)aminomethan, N,N-methylen-bisakrylamid (BIS), β -nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfát redukovaný, tetrasodná sůl (NADPH).

GE healthcare, USA: Chelatovací sepharosa.

Genomed, Německo: JETquick-Gel Extraction Spin Kit.

Chemos, ČR: Kyselina δ -aminolevulová.

Invitrogen, USA: SYBR Safe™ DNA Gel Stain (10000x koncentrovaný).

Lachner, ČR: Kyselina octová, fenol, glycerol, hydroxid sodný, octan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan draselný, methanol, hydroxid draselný.

Linde, ČR: Oxid uhelnatý, kapalný dusík, plynný dusík.

Lonza, Švýcarsko: Agarosa s nízkým bodem tání.

New England Biolabs, USA: HindIII (c = 20000 U/ml), NdeI (c = 20000 U/ml), pufr NEB 2 (10x koncentrovaný), NcoI (c = 20000 U/ml), NEB 2 (10x koncentrovaný), T4 DNA ligasa (c = 400000 U/ml), pufr pro T4 DNA ligasu (10 x koncentrovaný), hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“ - BSA).

P-Lab, ČR: PEG 6000.

Penta, ČR: Octan amonný, chlorid sodný, octan hořečnatý, glycin.

Pharmacia, Švédsko: Ficoll.

Serva Electrophoresis, Německo: Triton X-100, dodecylsulfát sodný (SDS), ampicilin, isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), thiamin, leupeptin hemisulfát, bestatin hydrochlorid, visking dialyzační trubice 20/32 (MWCO 14000), kvasničný extrakt SERVABACTER, pepton z kaseinu (pankreatický), chloramfenikol, trypton z kaseinu (pankreatický), RNAsa A, N,N,N',N'-tetramethylethyldiimin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES).

Sigma-Aldrich, USA: Dimethylsulfoxid (DMSO), LB medium, 8-hydroxychinolin, dithioničitan sodný, fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), aprotinin, α -naftoflavon, imidazol, kyselina bicinchinová (BCA), glutathion, 1,2-dilauryl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DLPC).

Thermo Scientific, Velká Británie: Agar.

- Plasmid 1B1/pOTB7 byl izolován v rámci mé bakalářské práce.
- Plasmid pCW byl připraven Mgr. Janem Milichovským na katedře biochemie přírodovědecké fakulty UK.
- Plasmid obsahující místo kódující TEV proteasu byl získán od Prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D.
- Bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3)RIL a XL10 gold byl poskytnut RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D.
- Bakteriální kmen *E. coli* DH5a byl získán od The Coli Genetick Stock Center (University Yale, USA).
- Potkaní NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu poskytl Mgr. Jan Milichovský.
- Lidský cytochrom b₅ poskytl Mgr. Jan Milichovský.

3.2 Přístroje

Analytické váhy	AEA 100g, Schoeller instruments analytické váhy 40 SM-200A, Pesa
Autokláv	Varioklav 400E, H + P Laborortechnik GmbH
Automatické pipety	BIOHIT, NichipetEX, makropipety Acura® 835
Bezdotykový kahan	Gasprofi2 SCS, VLD – TEC
Centrifuga	Centrifuge 5415R, Eppendorf Stolní centrifuga, Labnet Allegra X-22R, Beckman Coulter, s výkyvným rotorem SX4250 a úhlovým rotorem F0630 Janetzki K70D, MLW Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter; s úhlovým rotorem Ti 45 a Ti 70 T52.2, MLW
Drtič ledu	JÉGZÚZO, Solid
Elektroforetická aparatura	MSMINI-10 Horizontal Multi Sub Mini, Uvitec Mini-PROTEAN Buffer Tank, BIO-RAD
Elektroforetická cela	Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BIO-RAD
Fotoaparát	DMC-LS65, Panasonic
HPLC	1200 series, Agilent
Incubátor	Automatic CO ₂ incubator IR 1500, Flow Laboratories
kolona pro HPLC	Chromolith® Performance RP-18e 100 x 4.6mm, Merk
Laboratorní váhy	440 – 35N, Kern EW 600-2M (KERN)
Laminární Box	Bio 126, Labox
Magnetická míchačka	KMO2 basic, IKA-WERKE HM2A, Laboratorní přístroje Praha
Míchací motor	RW 16 Basic, IKA
Mikrovlnná trouba	KOR – 6L05, DAEVOO ELECTRONICS
Mrazák	Ultra low temperature freezer U410, New Brunswick Scientific Freezer MDF-U53V, Sanyo

	FHE 306B, Gorenje
Ohřívač / Chladič	ThermoE CHB – A4 – 9602
Ohřívač / Chladič bloků	LS1 V.668.161.520, VLM GmbH
pH metr	model 370, ATI Orion
Sonikátor	UC 005 AJ1, Tesla
Spektrofotometr	Helios α, Thermo spectronic Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent Technologies Specord M40, Carlzeiss Jena Sunrise Absorbance Reader, TECAN Spekol 11, Carl Zeiss, Jena
Sterilizér	MOV – 212S, SANYO
Termocykler	Techne FTGENE2D, LAB system Praha
Transluminátor	Dark reader transluminator DR-45H, Clare chemical research
Třepačka	Gallenkamp, Corbi – safe TS net wise MS2 Minishaker, IKA G24 Environmental Incubator shaker, New Brunswick Scientific GFL 1092, MERCI s.r.o.
Ultrafiltrační cela	Millipore Express PLUS Membrane Filter, polyethersulfone, Hydrophilic, 0.22 μm, 47 mm, Merk Millipore Amicon 8200 s membránou PM-30, Merk Millipore
Vakuová odparka	DNA SpeedVac 110 DNA, SAVANT UL 3101-1/61010-1, LABCONCO
Vodní lázeň	Julanbo TW2, Biotech
Vortex	Velp scientifica Rx-3, P – LAB a.s.
Vyhřívač kolony pro HPLC	Column even, LCO 102 single
Výrobník ledu	IM 006S, STAINLESS STEEL
Zdroj pro elektroforesu	EPS 301, electrophoresis power supply, GE Healthcare Bio – sciences AB

3.3 Metody

3.3.1 Polymerasová řetězová reakce – PCR

Bylo provedeno PCR upravující a amplifikující gen pro CYP1B1 v izolovaném plasmidu za vzniku dvou jeho forem. Pomocí navržených primerů byly na začátek i konec genu přidány štěpící místa pro restrikční endonukleasy. Na 5'-konci byla přidána místa pro endonukleasy EcoRI a NdeI, na 3'-konci pak štěpící místo pro endonukleasu HindIII. U amplifikovaného genu byla rovněž provedena delece druhého až čtvrtého kodónu a optimalizace pátého až desátého kodónu dle [112].

Na 3'-konci byl navíc přidán úsek DNA kódující histidinovou kotvu. V další variantě byl 3'-konec genu rozšířen o úsek kódující štěpící místo pro TEV proteasu. Tento úsek byl vložen před místo kódující histidinovou kotvu. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tabulka 2.

Tabulka 2 PCR primery upravující gen CYP1B1.

Název	Sekvence
CYP1B1-fw-2-4-del	5'- GACGAATTCATATGCTTTCTCCAAATGATCCATGGCC GCTAAACCCG -3'
CYP1B1-rev-TEVHis6	5'- TATCTAAGCTTCATTAATGATGATGATGATGATGTTG GCAAGTTTCCTTGGC -3'
CYP1B1-rev-His6	5'- TATCTAAGCTTCATTAATGATGATGATGATGATGGCC CTGGAAATACAAGTTTTCTTGGCAAGTTTCCTTGGC -3'

Do roztoků primerů bylo přidáno takové množství mQ sterilní vody, spočtené firmou, která syntetizovala primery, aby výsledná koncentrace jednotlivých primerů byla 100 pmol/μl. Z těchto zásobních roztoků byla část odebrána a pětinasobným zředěním z ní byly připraveny pracovní roztoky s koncentrací 20 pmol/μl, jež byly použity v reakční směsi polymerasové řetězové reakce. Jako templát obou PCR reakcí byl použit 50x zředěný plasmid izolovaný v rámci mé bakalářské práce [113].

Reakční směs o celkovém objemu 50 μl byla pro obě formy genu navržena dle [114]:

- 1 µl templátu (50x zředěný)
- 1 µl forward (CYP1B1-fw-2-4-del)
- 1 µl reverse (CYP1B1-rev-His6 / CYP1B1-rev-TEVHis6)
- 1 µl nukleotidtrifosfát (10 mmol/l)
- 5 µl pufru pro Pfu polymerasu (10x koncentrovaný)
- 6 µl MgSO₄ (25 mmol/l)
- 2 µl DMSO
- 1 µl Pfu polymerasy
- 32 µl sterilní mQ vody

Připravené reakční směsi byly vloženy do termocykleru (Techne FTGENE2D), který byl nastaven následovně:

Část 1:

- teplota kondenzace DNA 95°C; 2'

1. část nastavena na 1 cyklus.

Část 2:

- teplota kondenzace DNA: 95 °C; 30"
- teplota nasednutí primeru na DNA: 57 °C; 30"
- teplota polymerace DNA: 72 °C; 2'

2. část byla nastavena na 30 cyklů.

Část 3:

- teplota dopolymerování zbývajících DNA: 72 °C; 8'

3. část byla nastavena na 1 cyklus.

Část 4:

- teplota zastavení PCR: 4 °C

Vyhřívací teplota víka termocykleru byla nastavena na 103. °C.

3.3.2 Purifikace PCR produktu pomocí komerčního kitu

K reakční směsi polymerasové řetězové reakce byl přidán trojnásobek jejího objemu roztoku L1. Následně bylo postupováno dle návodu přiloženého u komerčního kitu „JET quick – Gel Extraction Spin Kit“ od firmy Genomed, kterým byla amplifikovaná DNA pomocí PCR purifikována.

Po přidání roztoku L1 (obsahuje chloristan sodný) byla směs zahřívána po dobu 15 minut na předem předeřátém ohříváči bloků (LS1 V.668.161.520) na teplotu 50 °C. Obsah mikrozkušavky byl následně nanesen na iontoměničovou kolonku a celý celek byl centrifugován (Centrifuge 5415R, Eppendorf) po dobu 1 minuty při 12400g a laboratorní teplotě. DNA zachycená na iontoměniči byla promyta přidáním 500 µl roztoku L1 a centrifugována (Centrifuge 5415R, Eppendorf) za stejných podmínek.

DNA na kolonce byla poté promyta ještě 500 µl roztoku L2 (obsahuje chlorid sodný, Tris, EDTA; pH 7,5) a centrifugována (Centrifuge 5415R, Eppendorf) 1,5 minuty při 12400g a laboratorní teplotě. Z odpadní mikrozkušavky, ve které byla zasazena iontoměničová kolonka, byl odstraněn prosáklý roztok L2 a kolonka znovu centrifugována po dobu 1 minuty při 16100g a laboratorní teplotě.

Na kolonku bylo následně naneseo 50 µl sterilního TE pufru (10 mmol/l Tris/HCl; 1 mmol/l EDTA pH 8,0) předem předeřátého na 70 °C. Po zasáknutí pufru (přibližně 1 minuta) byla DNA centrifugací (Centrifuge 5415R, Eppendorf) po dobu 2 minut při 12400g a laboratorní teplotě eluována do čisté mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml).

3.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace plasmidové DNA a fragmentů DNA, sloužících k sestavení konstruktů, byla stanovena spektrofotometrem Helios α, resp. spektrofotometrem Cary 60. Těmito přístroji byly u vzorků DNA změřeny absorbance při třech vlnových délkách, resp. absolutní spektrum, z něhož byly odečteny hodnoty absorbancí třech vlnových délek, potřebných pro výpočet koncentrace (Vztah 1) a čistoty vzorku DNA (Vztah 2).

$$c = (A_{260} - A_{320}) \cdot \text{ředění} \cdot 50 \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Vztah 1 Vztah pro výpočet koncentrace plasmidové DNA pomocí spektrofotometrického stanovení. Číslo 50 udává: Pokud je A_{260} rovna 1, potom je koncentrace DNA rovna 50 µg/ml.

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Vztah 2 Vztah pro výpočet čistoty vzorku DNA.

Znečištění vzorků DNA bývá často způsobeno proteiny absorbujícími záření o vlnové délce 280 nm. Díky této skutečnosti je ve vztahu pro výpočet čistoty DNA zahrnuta korekce na absorbanci při 320 nm. Doporučená hodnota spočteného poměru by měla ležet přibližně mezi hodnotami 1,8 – 2 [115].

3.3.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Před ligací obou forem genů cytochromu P450 1B1 – insertů do plasmidu pCW bylo potřeba provést dvojité štěpení jak insertů, tak plasmidu pomocí restrikčních endonukleas NdeI a HindIII.

Pro prvotní potvrzení úspěšnosti ligace insertu do vektoru pCW byla použita restrikční endonukleasa NcoI.

Díky aplikaci „Double Digest Finder“ firmy New England Biolabs [116] byly nalezeny optimální podmínky pro štěpení. Do mikrozkušavek Eppendorf (0,2 ml) byly pipetovány následující štěpící směsi. Všechny štěpící reakce probíhaly přes noc při 37 °C .

Pro štěpení insertů byla použita směs:

- 1 µl NdeI
- 1 µl HindIII
- 2 µl NEB2 pufru
- 16 µl roztoku insertu

Pro štěpení plasmidu pCW byla použita směs:

- 1 µl NdeI
- 1 µl HindIII
- 3 µl NEB2 pufru
- 25 µl roztoku plasmidu

Pro ověření konstruktu byla použita štěpící směs:

- 3 µl pDNA
- 1 µl NcoI
- 2 µl NEB3 pufru
- 14 µl mQ sterilní H₂O

3.3.5 Agarosová elektroforesa

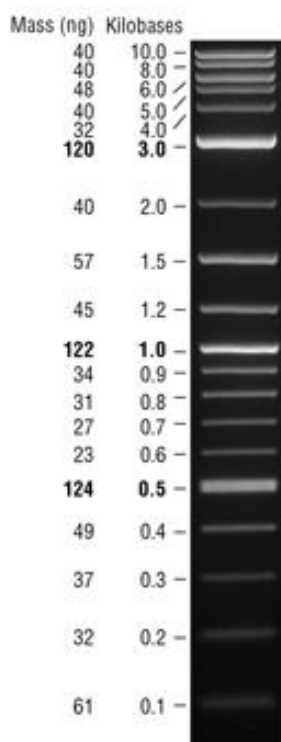
Rozpuštěním 0,4 g agarosy ve 40 ml TAE pufru (40 mmol/l Tris, 20 mmol/l kyseliny octové a 1 mmol/l EDTA pH 8,0) za horka byl připraven 1% roztok (w/v) agarosy s nízkým bodem tání. Po zchladnutí byly k roztoku přidány 2 µl barviva SYBER gel green (20000x zředěno). Směs byla promíchána a opatrně nalita do předem připravené elektroforetické vaničky s gumovými „spacery“ na koncích bránícími kapalině ve výtoku z vaničky. Do nalitého gelu byl opatrně zasazen hřeben, kterým byly z gelu odstraněny případné bublinky vzniklé nalitím gelu do elektroforetické vaničky. Nalitá směs se zasazeným hřebenem byla přibližně 30 minut ponechána tuhnout.

V průběhu tuhnutí gelu byly připravovány vzorky DNA pro stanovení. Roztok DNA byl smíchán se vzorkovým pufrům (40% sacharosa (w/v), 0,1% bromfenolová modř (w/v)) v poměru 4:1 z pohledu roztoku DNA. Podobným způsobem byla připravena i směs standardu molekulových hmotností 2-Log DNA Ladder (1 díl standardu, 4 díly vzorkového pufru (2,5% ficoll 400 (w/v); 11 mmol/l EDTA; 3,3 mmol/l Tris/HCl; 0,017% SDS (w/v); 0,015% bromfenolová modř (w/v)) – 6x koncentrovaného a 19 dílu sterilní mQ vody).

Ze ztuhlého gelu byl opatrně vyndán hřeben a sundány gumové „spacery“. Vanička byla vložena do elektroforetické aparatury (MSMINI-10 Horizontal Multi Sub Mini) a převrstvena TAE pufrům. Do jamek byly pomocí automatické pipety nanášeny vzorky. Elektroforesa probíhala při 110 V po dobu 40 minut.

Po ukončení elektroforesy byl gel vyhodnocen na transluminátoru (Dark reader transluminator DR-45H) dle standardu komerční firmy NEB (Obrázek 11), na kterém jsou znázorněny relativní vzdálenosti mezi standardy různých velikostí na složení elektroforetického gelu [117]. Na elektroforesu bylo použito 0,25 µl standardu (Hodnoty hmotností jednotlivých fragmentů DNA na Obrázek 11 odpovídají nanášení 1 µl standardu.

Hmotnosti fragmentů DNA – standardů na gelech agarosové elektroforezy v této práci jsou tedy 4x menší.).



Obrázek 11 Marker 2-Log DNA ladder. Převzato z [117].

3.3.6 Izolace DNA z agarosového gelu

Na analytických vahách (AEA 100g, Schoeller instruments) byly zváženy popsané sterilní mikrokumavky Eppendorf (1,5 ml). Z transluminátorem osvětleného agarosového gelu byl pomocí skalpelu vyříznut plátek gelu se štěpenou DNA, která měla být po své izolaci použita k ligaci. Vyříznutý gel s DNA byl poté nakrájen na menší kousky kvůli rychlejšímu rozpouštění gelu na ohříváči bloků (LS1 V.668.161.520) předem předeřtém na 67 °C, kam byla mikrokumavka s agarosovým gelem umístěna na dobu 10 minut, resp. na dobu, dokud se gel zcela nerozpustí. K rozpuštěnému gelu byl přidán stejný objem sterilního TE pufru (10 mmol/l Tris/HCl; 1 mmol/l EDTE pH 8,0) předeřtého na 67 °C.

Teplota směsi byla udržována na 67 °C, dokud ke směsi nebyl přidán stejný objem přečištěného fenolu s pH > 7,8. Všechny další kroky již mohly být prováděny za laboratorní teploty. Směs byla vortexována (Velp scientifica Rx-³) 15 sekund a následně centrifugována při 16100g 3 minuty (Centrifuge 5415R Eppendorf). Vrchní, vodná fáze

byla převedena do čisté mikrozkušavky. Celá extrakce přečištěným fenolem byla provedena dvakrát.

K vodné fázi byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol v poměru 25:24:1. Směs byla opět vortexována a centrifugována dle podmínek z předchozího odstavce, vodná fáze byla převedena do čisté mikrozkušavky. Celý proces se směsí fenol/chloroform/isoamylalkohol byl proveden také dvakrát.

Celá extrakce byla provedena za stejných podmínek jako předchozí dvě ještě s chloroformem, tentokrát už pouze jednou.

Získaná vodná fáze byla 15 minut chlazená v ledové lázni a následně centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) při 16100g po dobu 15 minut při 4 °C. Supernatant byl převeden do čisté mikrozkušavky, v níž byl změřen jeho objem.

K supernatantu bylo přidáno 20% jeho objemu octanu amonného (10 mol/l) a 200% jeho objemu ledově vychlazeného ethanolu (100%), směs byla krátce promíchána a 30 minut ponechána stát při laboratorní teplotě (lze nechat stát i přes noc). Poté byla centrifugována při 16100g po dobu 30 minut a 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Po odstranění supernatantu byla peleta promyta 200 µl ledově vychlazeným 70% ethanolem (v/v) (o teplotě -20 °C). Směs byla centrifugována 2 minuty při 16100g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Většina supernatantu byla odsáta vakuovou odsávací koulí, zbytek ethanolu byl odstraněn pomocí sušení vzorku po dobu 3 minut na vakuové odparce (DNA SpeedVac). Promytá peleta byla rozpuštěna ve 20 µl TE pufru.

3.3.7 Ligace

Do mikrozkušavek Eppendorf (0,2 ml) byla pipetována ligační směs o celkovém objemu 30 µl. Poměr insert : plasmid byl volen dle koncentrace a množství získané DNA izolací z gelu. Byla ovšem snaha o dodržení pravidla, použít k ligaci všechnu získanou DNA, zejména insert. Množství použité T4 DNA ligasy bylo 0,5 µl a pufru pro T4 ligasu 3 µl. Pokud bylo potřeba doplnit reakční směs na celkový objem 30 µl, byla použita sterilní mQ H₂O.

Genová forma CYP1B1-T-his byla se štěpeným plasmidem pCW ligována v poměru 13,4 : 1, forma CYP1B1-his v poměru 12 : 1. Pipetovaná ligační směs byla

vložena do termocykleru (Techne FTGENE2D). Ligace probíhala po dobu 12 hodin při teplotě 16 °C.

3.3.8 Příprava agarových ploten s antibiotikem

V mikrovlnné troubě byl roztaven sterilní 1% (w/v) agar. Z roztaveného agaru bylo sterilně odlito jeho malé množství (10 – 15 ml na jednu Petriho misku) do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Po zchladnutí agaru ve zkumavce k němu bylo sterilně přidáno takové množství antibiotika, aby jeho výsledná koncentrace dosahovala požadovaných hodnot – 100 µg/ml pro ampicilin a 30 µg/ml pro chloramfenikol (v rámci této práce byly při přípravě ploten používány pouze tyto koncentrace antibiotik). Vzniklá směs agaru s antibiotikem byla promíchána a sterilně převedena do předem připravených sterilních Petriho misek, kde se směs nechala ztuhnout. Misky s nalitou směsí agaru a antibiotika byly ponechány ve vodorovné poloze, dokud agar v Petriho miskách neztuhl.

3.3.9 Výsev buněk na Petriho misky

Buněčná kultura, do které byl transformován cílový plasmid, byla po inkubaci sterilně převedena do Petriho misky obsahující ztuhlý agar s antibiotikem. Směs byla rozprostřena po celé ploše Petriho misky a několik minut ponechána vsakovat do agaru. Plotny byly po vsáknutí buněčné kultury obráceny dnem vzhůru a na noc umístěny do inkubátoru (Automatic CO₂ IR 1500) o teplotě 37 °C.

Kontrola čistoty práce byla ověřena za pomoci kontrolní Petriho misky, která byla připravena stejným způsobem jako Petriho miska, na kterou byla nanесena buněčná kultura s transformovaným plasmidem. Jen s tím rozdílem, že buňky nanесené na agar v sobě neobsahovaly žádný transformovaný plasmid.

3.3.10 Transformace

Kompetentní buňky *E. coli* byly vyjmuty z mrazáku (-80 °C) a ponechány rozmraznout v ledové lázni. Z alikvotu o objemu 200 µl bylo přeneseno 100 µl do nové, sterilní mikrozkuavky Eppendorf (1,5 ml). K buňkám byla přidána ligační směs (případně 1 µl konstrukt), resp. stejné množství mQ sterilní vody pro kontrolní ověření

čistoty práce. Obsah mikrozkušavky byl promíchán špičkou pipety bez nasátí. Po promíchání směsi byla mikrozkušavka umístěna na 30 minut do ledové lázně. Po vyjmutí z ledové lázně byla mikrozkušavka vložena přesně na 90 sekund do ohříváče bloků (LS1 V.668.161.520) předem vyhřátého na 42 °C, poté byla vrácena do ledové lázně na dobu dvou minut.

K buňkám bylo přidáno 300 µl sterilního LB media (resp. trojnásobné množství použitého objemu buněk). Po přidání media byly buňky inkubovány v inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla směs vyseta na připravenou plotnu s ampicilem 100 µg/ml (v rámci této práce byla při transformaci použita pouze tato koncentrace antibiotika). Agarové plotny byly po vsáknutí směsi do agaru otočeny dnem vzhůru a umístěny na noc do inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) o teplotě 37 °C.

3.3.11 Přeočkování vybraných kolonií metodou „single cell“

Z kultury, která přes noc narostla na agaru v Petriho miskách, byly vybrány 3 „single cell“ kolonie, jež byly dostatečně vzdáleny od ostatních kolonií. Plocha vybraných kolonií byla ze spodku Petriho misky podbarvena popisovačem, kvůli spolehlivé identifikaci.

Plamenem bezdotykového plynového kahanu byla vyžihána pinzeta, již bylo následně uchopeno párátka. Vybraná „single cell“ kolonie byla za pomoci uchopeného párátka a pinzety přenesena do předem připraveného sterilního LB media ve zkumavce Falcon (50 ml), případně do Erlenmayerovy baňky, s antibiotikem o známé koncentraci (ampicilin 100 µg/ml nebo chloramfenikol 30 µg/ml – v této práci byly používány pouze tyto koncentrace antibiotik). Nádoba, do které byla přenesena kolonie, byla s povoleným víčkem, resp. překryta alobalovou folií a inkubována v třepačce při 37 °C a 220 RPM přes noc. Tímto způsobem získaná kultura byla použita na izolaci plasmidové DNA (Do malé části kultury byl přidán glycerol do výsledné koncentrace 5% (v/v) a směs – glycerolový štok byl uschován v -80 °C pro další použití.) nebo na inokulaci modifikovaného TB media za účelem následného zahájení indukce proteinové synthesy.

3.3.12 Čištění fenolu

Do zkumavky Falcon (50 ml) bylo odebráno přibližně 20 ml fenolových krystalů. Obsah zkumavky byl rozpuštěn ve vodní lázni při 70 °C, smíchán s 8-hydroxychinolinem (ve výsledné koncentraci 0,1% (w/v)) a stejným objemem Tris/HCl o koncentraci 1 mol/l a pH 8,0. Směs byla protřepávána 10 – 15 minut. Po rozdělení fází byla ze směsi odebrána vrchní vodná fáze. Pro dostatečnou čistotu fenolu bylo potřeba proces vytřepání několikrát zopakovat. Čistý fenol byl uskladněn ve směsi s chloroformem a isoamylalkoholem (fenol : chloroform : isoamylalkohol = 25 : 24 : 1) v tmavé láhvi při 4 °C a převrstven hladinou Tris/HCl pufru o koncentraci 1 mol/l.

3.3.13 Izolace plasmidu alkalickou lyzí a fenol-chloroformovou extrakcí

Zkumavky Falcon (50 ml) s narostlou „overnight“ kulturou byly s utaženými víčky vloženy do centrifugy (Allegra X-22R) a centrifugovány 20 až 30 minut při 3901g a 4 °C. Supernatant byl oddělen a peleta resuspendována 200 µl ledově vychlazeného roztoku GTE (50 mmol/l glukosa; 25 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0; 10 mmol/l EDTA). Resuspendovaná peleta byla převedena do sterilní mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml) a ponechána 5 minut stát při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 300 µl čerstvě namíchaného lyzačního pufru – roztok 0,2 mol/l NaOH a 1% SDS (w/v)): 200 µl 5 mol/l NaOH bylo smícháno se 4,3 ml sterilní mQ H₂O a 500 µl 10% SDS (w/v). Po přidání pufru do mikrozkušavky byl její obsah několikerým převrácením promíchán. Obsah mikrozkušavky byl poté 5 minut ponechán stát při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo dále přidáno 200 µl ledově vychlazeného draselno-acetátového pufru (3 mol/l K⁺ a 5 mol/l CH₃COOH / CH₃COO⁻; pH 4,8). Obsah byl otáčením mikrozkušavky míchán po dobu 10 sekund. Po promíchání byla mikrozkušavka inkubována 10 minut v ledové lázni.

Po skončení inkubace byla směs centrifugována 10 minut při 15000g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Supernatant byl převeden do čisté, sterilní mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml).

K supernatantu byl poté přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol v poměru 25 : 24 : 1. Směs byla několikrát protřepána a centrifugována 2 minuty při 5400g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Horní,

vodná fáze byla převedena do čisté, sterilní mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml). Celý krok s fenol-chloroformovou extrakcí byl následně proveden podruhé.

K vodné fázi byl přidán stejný objem chloroformu, směs byla několikrát protřepána a centrifugována 5 minut při 15000g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Horní, vodná fáze byla převedena do čisté, sterilní mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml). Celý krok s chloroformovou extrakcí byl následně proveden podruhé.

K vodné fázi byl přidán stejný objem ledově vychlazeného isopropanolu (o teplotě -20 °C). Obsah mikrozkušavky byl promíchán a ponechán inkubovat 30 minut v ledové lázni. Po ukončení inkubace byla směs centrifugována 30 minut při 16100g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Po odstranění supernatantu byla peleta promyta 200 µl ledově vychlazeného 70% ethanolu (v/v) (o teplotě -20 °C). Směs byla centrifugována dvě minuty a 16100g při teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Většina supernatantu byla odsáta vakuovou odsávací koulí, zbytek ethanolu byl odstraněn pomocí sušení vzorku po dobu 3 minut ve vakuové odparce (DNA SpeedVac).

Získaná peleta byla rozpuštěna ve 100 µl sterilního TE pufru (10 mmol/l Tris/HCl; 1 mmol/l EDTA pH 8,0). Po rozpuštění pelety bylo ke směsi přidáno 0,5 µl RNasy A (10 mg/ml). Obsah byl promíchán a inkubován 40 minut při 55 °C (LS1 V.668.161.520). Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 60 µl PEG pufru (20% PEG 6000 (v/v); 2,5 mol/l NaCl), vzorek byl promíchán a ponechán inkubovat 1,25 h v ledové lázni.

Po skončení inkubace byla směs centrifugována 15 minut při 15000g a teplotě 4 °C (Centrifuge 5415R Eppendorf). Po odstranění supernatantu byla peleta promyta 200 µl ledově vychlazeného 70% ethanolu (v/v) (o teplotě -20 °C). Po centrifugaci (2 minuty, 16100g, 4 °C - Centrifuge 5415R Eppendorf) a odstranění veškerého ethanolu (3 minuty - DNA SpeedVac) byla peleta rozpuštěna ve 20 µl sterilního TE pufru, případně sterilní mQ vody pokud měla být získána DNA podrobena sekvenční reakci. Získaný roztok DNA byl uložen v -80 °C. U roztoku DNA byla před jeho uložením do -80 °C spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota a změřeno absolutní spektrum.

3.3.14 Příprava vzorků pDNA na sekvenční reakci

Oba připravené vektory na bázi plasmidu pCW CYP1B1-his2b i CYP1B1-T-his2c byly poslány na své ověření pomocí sekvenční reakce do Laboratoře sekvenace DNA

Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7. Pro sekvenační reakci vektoru na bázi plasmidu pCW byl použit 1 mg plasmidové DNA. Primery použité při sekvenaci jsou uvedeny v Tabulka 3.

Tabulka 3 Primery použité při sekvenaci DNA.

Název	Sekvence	Použití
pCW-forw	5'- GTTTTGCACCATTCGATG -3'	Forward primer pro vektory na bázi pCW
pCW-rev	5'- CGTCTTCAAGCAGATCTG -3'	Reverse primer pro vektory na bázi pCW

Celkový objem vzorku pro sekvenační reakci byl 10 μ l. Složení vzorku bylo následující:

- 2 μ l pDNA konstruktů
- 1,7 μ l pCW-forw ($c_{DNA} = 3,2$ pmol/ μ l)
- 1,7 μ l pCW-rev ($c_{DNA} = 3,2$ pmol/ μ l)
- 4,6 μ l mQ H₂O

3.3.15 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Stanovení koncentrace cytochromu P450 ve vzorku sloužilo k průběžnému sledování růstu množství cytochromu v buňkách v průběhu jeho exprese nebo jako nástroj pro charakterizaci izolovaného preparátu.

Odebraný vzorek buněčné kultury, v níž probíhala produkce cytochromu P450, byl centrifugován 2 minuty při 7200g a laboratorní teplotě (Centrifuge 5415R Eppendorf). Peleta byla rozpuštěna v CO pufru (100 mmol/l KH₂PO₄, 50% glycerol (v/v); pH 7,4) a směs pipetována do semimaskované kyvety. V případě izolovaného preparátu nebylo ředění vzorku CO pufrem potřeba.

U takto připraveného vzorku bylo na spektrofotometru Cary 60 (Specord M40) změřeno spektrum v rozsahu 400 až 500 nm. Jako reference byl použit tentýž vzorek. Do měřeného vzorku bylo přidáno malé množství dithioničitanu sodného, vzorek byl promícháván až do úplného rozpuštění všech krystalků dithioničitanu a probublán slabým proudem oxidu uhelnatého po dobu 1 minuty. U tohoto vzorku pak bylo změřeno

diferenční spektrum. Množství přítomného cytochromu P450 ve vzorku bylo spočteno ze vztahu 3.

$$c_x = \frac{A_x - A_{490}}{\varepsilon_x} \times \text{ředění} \quad [\mu\text{mol/l}]$$

Vztah 3 Výpočet koncentrace cytochromu.

A_x – absorbance vzorku při vlnové délce 420 nm, resp. 450 nm

ε_x – absorpční molární koeficient pro vlnovou délku 420 nm, resp. 450nm

$\varepsilon_{P420} = 0,111 \text{ dm}^3/(\mu\text{mol} \cdot \text{cm})$

$\varepsilon_{P450} = 0,091 \text{ dm}^3/(\mu\text{mol} \cdot \text{cm})$

c_x – koncentrace cytochromu P₄₂₀, resp. P₄₅₀

3.3.16 Kultivace buněk *E. coli* v menším množství media pro testovací expresi

Testovací exprese v menším množství media měla za úkol vybrat buněčný kmen pro expresi proteinu ve větším množství media a určit přibližnou dobu proteinové exprese. Vedle toho byla také pozorována rychlost růstu buněčné kultury v závislosti na způsobu inokulace media.

Do Erlenmayerovy baňky (500 ml) bylo vpraveno 50 ml sterilního modifikovaného TB media [115] a ampicilin do výsledné koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$. Takto upravené modifikované TB medium bylo inokulováno buněčnou kulturou *E. coli*. V případě kmene DH5 α byla provedena „multi cell“ inokulace opláchnutím agarů v Petriho misce s narostlými „single cell“ koloniemi, obsahujícími transformovaný plasmid CYP1B1-his2b/pCW, resp. CYP1B1-T-his2c/pCW, 2 ml modifikovaného TB media. U kmene XL10 gold byla inokulace modifikovaného TB media provedena kulturou v podobě zmražených glycerolových štoků (obsahovaly glycerol v koncentraci 5% (v/v)), které rovněž obsahovaly bakterie s transformovanými plasmidy CYP1B1-his2b/pCW, resp. CYP1B1-T-his2c/pCW, jako tomu bylo u typu DH5 α . Baňky s inokulovaným modifikovaným TB mediem byly inkubovány v třepačce při 37 °C a 220 RPM.

Po nárůstu kultury na požadovanou optickou denzitu ($\text{OD}_{600} = 0,6 - 1,0$) byla provedena indukce syntézy proteinu pomocí IPTG ve výsledné koncentraci 1 mmol/l pro kmen DH5 α , resp. 0,5 mmol/l v případě kmene XL10 gold, a ALA ve výsledné koncentraci 0,5 mmol/l pro kmen DH5 α , resp. 0,2 mmol/l v případě kmene XL10 gold. Po

indukci proteinu v kmeni DH5 α byly podmínky inkubace upraveny na 32 °C a 200 RPM. Expres proteinu byla sledována po dobu 48 h, resp. 54,5 h u kmene DH5 α [112].

Složení modifikovaného TB media (pro 1 litr media):

- 12 g tryptonu
- 24 g kvasničného extraktu
- 2 g peptonu
- 4 ml 100% glycerolu
- 12,31 g K₂HPO₄
- 2,31 g KH₂PO₄
- Thiamin do koncentrace 1 mmol/l
- mQ sterilní voda

Navážená množství tryptonu, kvasničného extraktu a peptonu byly mQ destilovanou vodou rozpuštěny ve Scottových láhvích (1 l) tak, aby byl celkový objem roztoku asi 900 ml. Tento roztok byl autoklávován 20 minut při 121 °C (Varioklav 400E) spolu s připraveným 50% roztokem glycerolu (v/v) a 100 ml roztoku obsahující navážená množství draselných solí kyseliny fosforečné.

Ke sterilní směsi tryptonu, kvasničného extraktu a peptonu bylo přidáno 8 ml sterilního 50% glycerolu (v/v), 100 ml roztoku draselných solí kyseliny fosforečné a thiamin do výsledné koncentrace 1 mmol/l. Do připraveného modifikovaného TB media byl před inokulací přidán ještě ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml media.

3.3.17 Kultivace buněk *E.coli* ve větším množství media pro velkoexpresi

Kultivace buněk ve větším množství media měla za úkol získat buňky s co možná nejvyšším obsahem nasyntetizovaného proteinu. Expres proteinu v buňkách probíhala z vektorů CYP1B1-his2b/pCW a CYP1B1-T-his2c/pCW. Oba vektory byly transformovány do buněk *E. coli* DH5 α použitých pro heterologní expresi proteinu. Z narostlých kolonií byla metodou „single cell“ následně připravena „overnight“ kultura použitá pro očkování modifikovaného TB media použitého pro velkoexpresi.

Do sterilní Erlenmayerovy baňky (2 l) bylo vpraveno 500 ml sterilního modifikovaného TB media s ampicilinem ve výsledné koncentraci 100 µg/ml a 1 ml „overnight“ kultury. Baňka byla inkubována v třepačce (Gallenkamp) při 37 °C a 220 RPM. Během inkubace byla sledována optická denzita OD₆₀₀ kultivované kultury proti vodě.

Jakmile dosáhla optická denzita OD₆₀₀ hodnoty blízké hodnotě OD₆₀₀ = 2,0, byla zahájena indukce produkce proteinu přidáním IPTG do výsledné koncentrace 1 mmol/l a ALA do výsledné koncentrace 0,5 mmol/l. Podmínky kultivace byly změněny na 30 °C a 200 RPM [112].

V buňkách s vektorem CYP1B1-his2b/pCW probíhala kultivace celkem 48 h (z toho 36 h exprese), s vektorem CYP1B1-T-his2c/pCW probíhala kultivace celkem 24 h (z toho 12 h exprese). Během kultivace obou kultur bylo v buňkách nahodile stanovováno množství cytochromu P450 za pomoci spektrofotometru Specord M40. Produkce proteinu probíhala do doby, kdy koncentrace cytochromu P450 v buňkách nedosáhla koncentrace alespoň 300 nmol/l kultury.

3.3.18 Příprava sferoplastů

Buněčná kultura s naprodukováním množstvím proteinu byla centrifugována 30 minut při 3000 RPM a teplotě 4 °C (Janetzki K70D). Získaná peleta byla resuspendována ve vychlazeném (4 °C), 2x koncentrovaném TSE pufru (100 mmol/l Tris/octan, pH 7,6; 500 mmol/l sacharosa; 0,5 mmol/l EDTA) v množství 5 ml pufru na 100 ml původní kultury. Rozpuštěná peleta byla neustále uchovávána v ledové lázni. K peletě byl přidán roztok lysozymu do výsledné koncentrace 0,2 mg/ml a směs byla ponechána za stálého míchání (150 otáček/minutu) reagovat po dobu 20 minut. K rozpuštěné peletě s lysozymem byl přidán stejný objem předem vychlazené (4 °C) mQ sterilní vody a po promíchání byla směs rozdělena do sterilních zkumavek Falcon (50 ml) a centrifugována 20 minut při 4000g a 4 °C (Allegra X-22R) kvůli oddělení fragmentů buněčné stěny. Získaná peleta obsahující sferoplasty byla rozpuštěna v SPH pufru (100 mmol/l KH₂PO₄, pH 7,4; 20% glycerol (v/v); 10 mmol/l β-merkaptioethanol; 6 mmol/l octanu hořečnatém) v množství 4 ml na 100 ml původní kultury.

3.3.19 Dezintegrace sferoplastů připravených z buněk *E. coli*

K připraveným sferoplastům byly před sonikací přidány inhibitory proteas (Tabulka 4) bránící degradaci proteinu po rozrušení cytoplasmatické membrány.

Tabulka 4 Inhibitory proteas přidané ke sferoplastům před sonikací.

Inhibitor	Výsledná koncentrace
PMSF	1 mmol/l
Aprotinin	1 µg/l
Leupeptin	2 µmol/l
Bestatin	1 µmol/l

Dezintegrace sferoplastů byla prováděna pomocí sonikátoru (UC 005 AJ1), jenž byl nastaven na výkon 55 W a 10 půlzů po dobu 30 sekund. Během sonikace sferoplastů byly tyto buňky bez buněčné stěny neustále míchány a chlazeny ledovou lázní.

Po dokončení sonikace byla směs kvůli oddělení nerozrušených sferoplastů, inkluzních tělísek, částí buněčných stěn a ostatních buněčných částí od dezintegrovaných sferoplastů centrifugována 10 minut při 7000g a 4 °C (Allegra X-22R). Ze získaného supernatantu, obsahujícího cytochrom P450 1B1 zabudovaný v membráně, byla v dalším kroku získána membránová frakce.

3.3.20 Příprava membránové frakce

Supernatant obsahující membránovou formu cytochromu P450 1B1 byl převeden do předem vychlazených kyvet (7 °C) pro ultracentrifugu Beckman (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K). Kyvety byly vyváženy na laboratorních vahách (440 – 35N) a vloženy do předem vychlazeného rotoru Ti-70 (7 °C) a rotor umístěn do centrifugy. Centrifugace probíhala 65 minut při 180000g a 4 °C.

Peleta obsahující membránovou frakci byla pomocí teflonového homogenizátoru resuspendována v 5ml SPH pufru, zamražena pomocí kapalného dusíku a uložena do -80 °C.

3.3.21 Solubilizace proteinů z bakteriální membrány

Resuspendovaná membránová frakce byla pomalu rozmražena a naředěna solubilizačním pufrém (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,4; 0,5 mol/l NaCl; 20% glycerol (v/v); 1% CHAPS (w/v); 10 mmol/l β -merkapt ethanol; 10 $\mu\text{mol/l}$ α -NF (methanolový roztok)) na objem 250 ml a za stálého chlazení ledovou lázní a míchání (150 otáček/minutu) ponechána solubilizovat po dobu 3 hodin.

Solubilizovaná směs byla převedena do předem vychlazených kyvet (7 °C) pro ultracentrifugu Beckman (Ultracentrifuga Optima™ LE-80K). Vyvážené kyvety byly vloženy do předem vychlazeného rotoru Ti-70 (7 °C) a rotor umístěn do centrifugy. Centrifugace, jež měla za cíl oddělit solubilní formu proteinu v supernatantu a prázdné membrány, resp. protein, který se nepodařilo z membrán solubilizovat, probíhala 65 minut při 100000g a 4 °C. Solubilní cytochrom P450 1B1 obsažený v supernatantu byl následně izolován.

3.3.22 Izolace a purifikace cytochromu P450 1B1 pomocí afinitní chromatografie

Během ultracentrifugace solubilizovaného cytochromu P450 1B1 byla kolona afinitní chromatografie Ni-IDA připravena na izolaci CYP1B1.

20% ethanol (v/v), v němž je zregenerovaná kolona v nečinnosti uchovávána, byl vypuštěn a kolona promyta 100 ml mQ sterilní vody a 30 ml equilibračního pufru (pufr SOLUB).

Na připravenou kolonu byl pomalu nanesen supernatant obsahující solubilní cytochrom P450 1B1. Normálně modro-zelená barva kolony zčervenala, tudíž protein byl nanesen na kolonu úspěšně.

Po nanesení CYP1B1 na kolonu afinitní chromatografie byla kolona promyta nejprve 100 ml pufru WASH1 (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,4; 0,5 mol/l NaCl; 20 mmol/l imidazol; 20% glycerol (v/v); 0,5% CHAPS (w/v); 10 mmol/l β -merkapt ethanol) a následně 100 ml pufru WASH2 (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,4; 0,5 mol/l NaCl; 100 mmol/l imidazol; 20% glycerol (v/v); 0,5% CHAPS (w/v); 10 mmol/l β -merkapt ethanol). Po promytí kolony pufrů WASH1 a WASH2 byl protein z kolony uvolněn za pomoci 100 ml

pufru ELUTE (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,4; 0,5 mol/l NaCl; 300 mmol/l imidazol; 20% glycerol (v/v); 0,5% CHAPS (w/v); 10 mmol/l β -merkaptoethanol).

Roztok obsahující formu CYP1B1_{hm} uvolněnou z kolony byl převeden do dialyzační trubice a dialyzován proti pufru DIA1 (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 0,1 mmol/l EDTA; 10% glycerol (v/v)). Po dvou hodinách dialýzy byla dialyzační trubice přendána do nového dialyzačního pufru DIA1 a ponechána dialyzovat rovněž po dobu 2 hodin. Na závěr byla dialyzační trubice přendána do pufru DIA3 (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 0,1 mmol/l EDTA; 20% glycerol (v/v)) a ponechána dialyzovat přes noc. Následující den byl dialyzovaný protein zahuštěn na objem přibližně 5 ml pomocí ultrafiltrační cely (Amicon 8200 s membránou PM-30), alikvotován, zmražen kapalným dusíkem a uložen v -80 °C.

V případě formy CYP1B1_m byl protein po uvolnění z kolony dialyzován 3 hodiny proti pufru DIA1_m (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 10% glycerol (v/v); 10 mmol/l β -merkaptoethanol; 0,5 mmol/l EDTA).

3.3.22.1 Štěpení TEV proteasou

Po skončení dialýzy byl u roztoku v dialyzační trubici změřen jeho objem a absorbance při 280 nm proti mQ vodě. Na základě těchto naměřených údajů a poměru 1 : 170 vzhledem k množství proteinů přítomných ve vzorku bylo spočteno množství TEV proteasy, které bylo následně přidáno k roztoku v dialyzační trubici. Na základě výpočtů bylo k roztoku v dialyzační trubici přidáno 200 μl TEV proteasy.

Směs byla dialyzována 3 hodiny proti pufru DIA2_m (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 10% glycerol (v/v); 5 mmol/l β -merkaptoethanol), 6 hodin proti pufru DIA3_m (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 10% glycerol (v/v)), dalších 6h proti novému pufru DIA3_m a poté ještě přes noc proti novému DIA3_m pufru. Po 5. dialýze by měl být z obsahu dialyzačního střeva odstraněn β -merkaptoethanol, který by po nanesení vzorku na kolonu afinitní chromatografie mohl kolonu zničit. Po nanesení dialyzátu na kolonu afinitní chromatografie byla na koloně zachycena TEV proteasa a odštěpené histidinové kotvy, cytochrom P450 1B1 bez odštěpené histidinové kotvy na koloně vázán nebyl.

Eluovaný CYP1B1, bez odštěpené histidinové kotvy, byl 2x dialyzován přes noc proti pufru DIA4_m (100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,5; 20% glycerol (v/v); 0,1 mmol/l EDTA), zahuštěn na přibližně 5 ml pomocí ultrafiltrační cely (Amicon 8200 s membránou PM-30), alikvotován, zmražen kapalným dusíkem a uložen v -80 °C.

3.3.23 Stanovení celkového proteinu metodou BCA

Stanovení koncentrace celkového množství proteinu metodou BCA využívá vzniku komplexu fialové barvy vznikajícího reakcí měďných iontů s BCA v alkalickém prostředí. Měďné ionty jsou získávány redukcí měďnatých iontů, které reagují s peptidovou vazbou a některými přítomnými aminokyselinami, resp. jejich funkčními skupinami. Intenzita zbarvení roztoku zjišťována spektrofotometrickým měřením při 562 nm je přímo úměrná koncentraci proteinu v roztoku [118].

Činidlo použité pro stanovení celkového proteinu ve vzorku bylo připraveno rozpuštěním BCA v 50 dílech roztoku A (0,95% NaHCO_3 (w/v); 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (w/v); 0,4% NaOH (w/v); 0,16% vinan sodný (w/v); pH 11,25) a jednom díle roztoku B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v)) takovým způsobem, aby výsledná koncentrace BCA byla 1% (w/v). Roztoky A a B byly smíchány až po úplném rozpuštění kyseliny bicinchoninové. Činidlo připravené smíšením roztoků A a B bylo připraveno až těsně před stanovením.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo vždy ve třech paralelních stanoveních pro každý měřený vzorek pipetováno 9 μl standardu, případně vhodně ředěných vzorků, a 260 μl připraveného činidla pro stanovení celkového proteinu. Standardem k vytvoření kalibrační přímky pro toto stanovení je BSA o koncentracích 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2 mg/ml. Do paralelních stanovení slepých vzorků byla namísto roztoku s proteinem pipetována destilovaná voda. Mikrotitrační destička s pipetovanou reakční směsí byla vložena do inkubátoru (IR 1500 Automatic CO_2 incubator) a ponechána inkubovat po dobu 30 minut. Po skončení inkubace byla směs v jamkách ponechána vytemperovat na laboratorní teplotu. Po zchladnutí byla u vzorků na čtečce mikrotitračních destiček (Sunrise Absorbance Reader) změřena absorbance při 562 nm. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu Kim32 [119].

3.3.24 Eletroforesa SDS-PAGE

Použité roztoky:

Složení 10% separačního gelu: 1,9 ml mQ H_2O ; 1,7 ml 30% BIS (w/v); 1,3 ml 1,5 mol/l Tris pH 8,8; 50 μl 10% SDS (w/v); 2 μl TEMED; 50 μl 10% APS (w/v)

Složení 15% separačního gelu: 1,1 ml mQ H_2O ; 2,5 ml 30% BIS (w/v); 1,3 ml 1,5 mol/l Tris pH 8,8; 50 μl 10% SDS (w/v); 2 μl TEMED a 50 μl 10% APS (w/v)

Složení 5% zaostřovacího gelu: 1,4 ml mQ H₂O; 330 µl 30% BIS (w/v); 250 µl 1,5 mol/l Tris pH 6,8; 20 µl 10% SDS (w/v); 2 µl TEMED a 20 µl 10% APS (w/v)

Vzorkový redukující pufr (4x koncentrovaný): 0,25 mol/l Tris/HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkaptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Elektrodotový pufr: 0,025 mol/l Tris/HCl; 0,192 mol/l glycín; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3

Barvicí lázeň: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň: 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného [120] byla v této práci využívána ke sledování množství cytochromu P450 jednotlivých krocích jeho izolace a následně ke stanovení výsledného produktu a ověření účinnosti odštěpení histidinové kotvy pomocí TEV proteasy. Proteiny na elektroforetickém gelu byly děleny na základě svých molekulových hmotností [121].

Do upevněných elektroforetických skel v držáku byl opatrně nalit spodní 10% (v případě stanovení TEV proteasy 15%) – separační gel tak, aby v gelu nebyly bublinky. Nalitý gel byl převrstven mQ destilovanou vodou bránící vyschnutí gelu a ponechán tuhnout po dobu 30 minut.

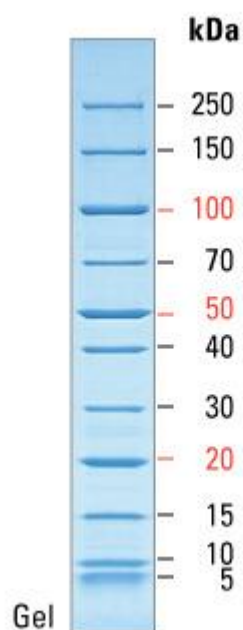
Během tuhnutí separačního gelu byly připraveny vzorky pro stanovení SDS-PAGE elektroforesou. Odebrané vzorky byly smíchány se vzorkovým redukujícím pufrem v poměru 3 : 1. Směs byla vortexováním (Velp scientifica Rx³) krátce promíchána a krátce centrifugována stolní centrifugou (Labnet). Směs byla poté kvůli denaturaci proteinů vařena po dobu 5 minut a poté znovu krátce centrifugována.

Ze separačního gelu byla odstraněna mQ destilovaná voda, již byl převrstven, a na ztuhlý gel byl nanesen 5% zaostřovací gel, do kterého byl ještě před jeho ztuhnutím zasazen hřeben s 15 jamkami. Gel byl dobu ponechán tuhnout po dobu 30 minut.

Ze ztuhlého gelu byl odstraněn hřeben a skla umístěna do elektroforetické cely (Mini-PROTEAN Tetra Modul), která byla poté umístěna do elektroforetické aparatury (Mini-PROTEAN Buffer Tank). Gel byl převrstven elektrodotovým pufrem a pomocí Hamiltonovy stříkačky byly do jamek nanесeny předem připravené vzorky a 5 µl markeru (Obrázek 12). Po nanесení vzorků a markeru byla elektroforetická aparatura zakryta víkem

a připojena ke zdroji napětí (EPS 301) nastaveném na 200 V. Elektroforesa probíhala až do doby, kdy se bromfenolová modř přiblížila na vzdálenost 1 cm k dolnímu okraji gelu.

Gel byl z aparatury přenesen do barvicí lázně, kde byl ponechán barvit po dobu 30 minut. Poté byl přenesen do odbarvovací lázně, která byla po 30 minutách vyměněna za novou. V této druhé, nové lázni, byl gel ponechán odbarvovat přes noc.



Obrázek 12 Standard molekulových hmotností PageRuler Unstained Broad Range Protein. Převzato z [122].

3.3.25 Příprava TEV proteasy

TEV (z angl. tabaco etch virus) proteasa je enzym pocházející z virového patogenu parazitujícím na rostlinách [123,124]. V této práci byla použita na odštěpení histidinové kotvy u jedné z proteinových forem. Tato cysteinová proteasa je schopna štěpit pouze na specifickém místě vloženém na konec proteinu před histidinovou kotvu pomocí metody PCR.

3.3.25.1 Produkce TEV proteasy

5 ml sterilního LB media obsahujícího ampicilin a chloramfenikol ve výsledných koncentracích 100 µg/ml, resp. 35 µg/ml u chloramfenikolu ve sterilní zkumavce Falcon

(50 ml) bylo naočkováno přibližně 10 μ l glycerolového štoku buněk *E. coli* kmene BL21(DE3)RIL obsahujícího plasmid s vloženým genovým úsekem kódujícím TEV proteasu. Zkumavka byla přes noc inkubována v třepačce při 37 °C a 220 RPM.

4 l sterilního LB media s ampicilinem a chloramfenikolem ve výsledných koncentracích 100 μ g/ml, resp. 35 μ g/ml u chloramfenikolu bylo rozděleno po 500 ml do sterilních Erlenmayerových baněk (2 l) a naočkováno získanou „overnight“ kulturou v množství 1 ml kultury na 1 l LB media. Erlenmayerovy baňky s naočkováným LB mediem byly inkubovány v třepačce při 37 °C a 220 RPM po dobu 4 hodin, dokud hodnota optické denzity nevrůstla na hodnotu $OD_{600} = 0,8$. Po nárůstu optické denzity na požadovanou hodnotu byla pomocí IPTG ve výsledné koncentraci 0,5 mmol/l media indukována syntéza TEV proteasy. Teplota inkubace byla snížena na 25 °C, protein byl ponechán produkovat přes noc.

3.3.25.2 Příprava sferoplastů

Druhý den byla kultura s naprodukovanou TEV proteasou centrifugována 30 minut při 3000 RPM a teplotě 4 °C (Janetzki K70D). Peleta z jednoho litru kultury byla resuspendována ve 30 ml Tris/HCl, pH 8,0 o koncentraci 50 mmol/l a centrifugována (Allegra X-22R) ve zkumavkách Falcon (50 ml) 20 až 30 minut při 3901g a 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta z 1 l kultury resuspendována ve 30 ml lyzačního pufru (20 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0; 0,1% Triton X-100 (w/v); 1 mol/l NaCl; 5 mmol/l β -merkaptoethanol; 5 mmol/l imidazol; 5% glycerol (v/v)) a inkubována na magnetické míchačce (150 otáček za minutu) s lysozymem ve výsledné koncentraci 0,1 mg/ml při 4 °C.

3.3.25.3 Dezintegrace sferoplastů připravených z buněk *E. coli*

Pro dezintegraci sferoplastů byl použit sonikátor (UC 005 AJ1) nastavený na výkon 45 W a 8 pulzů po dobu 30 sekund s 60 sekundovou přestávkou. Během sonikace sferoplastů byly tyto buňky bez buněčné stěny neustále míchány a chlazeny ledovou lázní.

Po dokončení sonikace byla směs kvůli oddělení nerozbitých sferoplastů, částí buněčných stěn a ostatních buněčných částí od dezintegrovaných sferoplastů centrifugována 30 minut při 15000g a 4 °C (Allegra X-22R).

3.3.25.4 Izolace TEV proteasy pomocí afinitní chromatografie

Supernatant získaný centrifugací sonikovaných sferoplastů byl nanesen na kolonu afinitní chromatografie (Ni-IDA) promytou ekvilibračním – lyzačním pufrem. Po nanesení vzorku na kolonu byla kolona promyta nejprve 50 ml promývacího pufru (20 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0; 1 mol/l NaCl; 5 mmol/l β -merkaptoethanol; 50 mmol/l imidazol; 5% glycerol (v/v)) a poté 50 ml elučního pufru (20 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0; 1 mol/l NaCl; 5 mmol/l β -merkaptoethanol; 300 mmol/l imidazol; 5% glycerol (v/v)).

Roztok obsahující TEV proteasu uvolněnou z kolony byl převeden do dialyzační trubice a dvakrát dialyzován proti dialyzačnímu pufru (20 mmol/l Tris/HCl, pH 7,5; 5% glycerol (v/v); 1 mmol/l EDTA; 10 mmol/l β -merkaptoethanol) po dobu 2 h.

Do dialyzovaného preparátu byl přidán glycerol do výsledné koncentrace 50% (v/v) a poté byl preparát zakoncentrováván (Amicon) do absorpance $A_{280} = 1,04$ ($\epsilon_{TEV} = 1,24$ l/(mol.cm)). Po dostatečném zakoncentrování byl preparát alikvotován a zamražen v -80°C .

3.3.26 Příprava rekonstituovaného systému a „markerové“ reakce

Do mikrozkušavky Eppendorf (200 μl) byl pipetován takový objem DLPC (chloroformový zásobní roztok 5 mg/ml), aby jeho výsledná koncentrace byla 2 mg/ml. Chloroform byl z mikrozkušavky za pomoci plynného dusíku ze zásobní láhve zcela odpařen. Do mikrozkušavky byly dále přidány sterilní mQ demineralizovaná voda, HEPES (zásobní roztok 500 mmol/l HEPES / KOH pH 7,4) do výsledné koncentrace 50 mmol/l, CHAPS (zásobní roztok 0,5 mg/ml) do výsledné koncentrace 0,05 mg/ml a glutathion (zásobní roztok 30 mg/ml) do výsledné koncentrace 3 mg/ml. Směs byla promíchána a ponechána sonikovat (UC 005 AJ1) do vzniku stabilní emulze tvořené liposomy. K získané emulzi byly přidány takové objemy cytochromu P450 1B1 a potkaní NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, aby jejich výsledná koncentrace byla 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Směs byla promíchána a 10 minut ponechána stát při laboratorní teplotě za účelem zanoření membránových částí enzymů do vzniklé membrány.

Do předem označených tlustostěnných zkumavek byla pipetována směs o celkovém objemu 0,5 ml, jež obsahovala předem spočítané množství fosfátového pufru (zásobní roztok 100 mmol/l, pH 7,4), předem připravený rekonstituovaný systém ve výsledné

koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a lidský cytochrom b_5 (zásobní roztok 52,7 $\mu\text{mol/l}$) v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla v požadovaném poměru vzhledem k enzymům v rekonstituovaném systému – viz výsledky. Směs byla promíchána a vložena na dobu 10 minut do třepačky (GFL 1092) s vodní lázní předem vyhřátou na teplotu 37 °C a 160 RPM za účelem preinkubace. Po 10 minutách byl k preinkubované směsi přidán Sudan I (zásobní roztok 5 mmol/l) do výsledné koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ a NADPH (zásobní roztok 10 mmol/l) do výsledné koncentrace 500 $\mu\text{mol/l}$, čím byla zahájena reakce. Reakce probíhala po dobu 20 minut při 37 °C a 160 RPM, ukončena byla přidáním 0,9 ml ethylacetátu do reakční směsi za účelem extrakce produktů reakce. Po ukončení extrakce byla směs oddělena za pomoci centrifugace (T52.2) po dobu 5 minut a 4000 RPM. Organická fáze byla odebrána pomocí Pasteurovy pipety a následně byla provedena nová extrakce rovněž s 0,9 ml ethylacetátu. Po spojení druhého extraktu prvním byl ethylacetát zcela odpařen na vakuové odparce (UL 3101-1/61010-1). Získaná peleta byla rozpuštěna v methanolu a stanovena pomocí HPLC, nebo uložena v -80 °C za účelem pozdějšího stanovení.

3.3.27 Analýza metabolitů pomocí HPLC na reverzní fázi

Získaná peleta, obsahující Sudan I a jeho metabolity, byla rozpuštěna v 50 μl methanolu, převedena do skleněných ampulek a analyzována pomocí HPLC (Agilent 1200 series).

Jako mobilní fáze pro stanovení Sudanu I a jeho metabolitů byl použit 75% (v/v) roztok methanolu s průtokem kolonou o rychlosti 1,5 ml za minutu. Pro stanovení byla použita kolona (Chromolith® Performance RP-18e 100 x 4.6mm) o délce 100 mm a průměru 4,6 mm se silikagelovou stacionární fází modifikovanou uhlovodíkovými řetězci C18. Kolona byla vyhřátá na 30 °C (column oven LCO 102). Při každém stanovení bylo na kolonu nanášeno 30 μl vzorku. K detekci byl použit detektor diodového pole (DAD) se štěrbinou o šířce 8 nm. Při měření byl detektor nastaven na zaznamenávání vlnových délek při 210 nm, 280 nm a 480 nm.

4 Výsledky

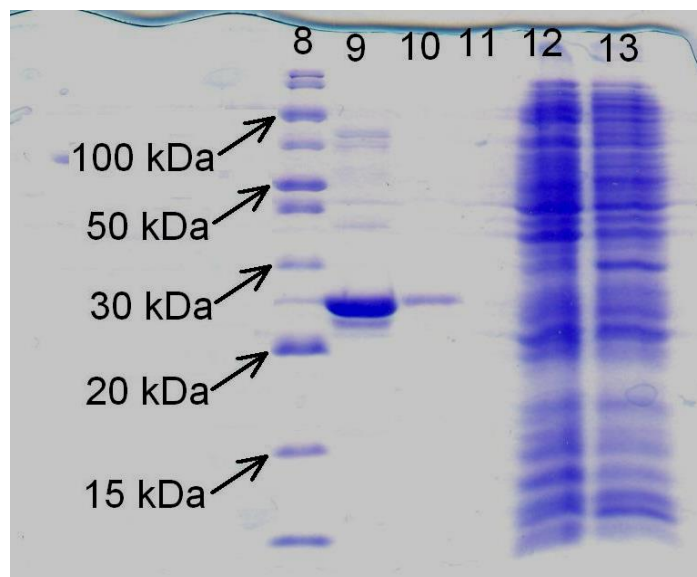
4.1 Příprava TEV proteasy

Narostlou „overnight“ kulturou byly inokulovány 4 l LB media. Po nárostu kultury do optické denzity $OD_{600} = 0,8$ byla pomocí IPTG ve výsledné koncentraci 0,5 mmol/l zahájena indukce syntézy proteinu, teplota byla poté snížena na 25 °C.

4.1.1 Izolace TEV proteasy pomocí afinitní chromatografie

Narostlá kultura byla centrifugována a dezintegrované sferoplasty z ní připravené byly naneseny na kolonu Ni-IDA. Po nanesení sonikátu na kolonu byla kolona promyta promývacím pufrem a následně z ní byla TEV proteasa uvolněna elučním pufrem. Eluát byl podroben dialýze a následně zahuštěn na požadovanou optickou denzitu.

Výsledný preparát TEV proteasy a vzorky odebrané během její izolace byly stanoveny pomocí SDS-PAGE elektroforesy (Obrázek 13).



Obrázek 13 Stanovení TEV proteasy a vzorků odebraných v průběhu její izolace.
 Dráha 8: Proteinový marker.
 Dráha 9: Neředěný vzorek TEV proteasy.
 Dráha 10: 15x naředěný vzorek TEV proteasy.
 Dráha 11: 100x naředěný vzorek TEV proteasy.
 Dráha 12: Vzorek sonikátu proteklého kolonou při izolaci TEV proteasy.
 Dráha 13: Vzorek promývacího pufru proteklého kolonou při izolaci TEV proteasy.

Z Obrázek 13 je patrné, že výsledný preparát má velikost odpovídající TEV protease. Preparát obsahuje také stopy nečistot, jejichž množství může být vzhledem k zastoupení TEV proteasy ve vzorku zanedbatelné.

4.2 Příprava cytochromu lidského P450 1B1

Pro přípravu cytochromu P450 1B1 byl použit konstrukt 1B1/pOTB7, jenž byl izolován z buněk *E. coli* DH5 α v rámci mé bakalářské práce [113]. U tohoto plasmidu, jenž byl poté použit jako templát pro PCR, byla v rámci mé bakalářské práce pomocí spektrofotometrického stanovení zjištěna jeho koncentrace a čistota [113].

Metodou PCR byl insert upraven a amplifikován. Na oba jeho konce byly vloženy palindromové sekvence restričních endonukleas, na 3'-konec genu byla vložena sekvence kódující histidinovou kotvu a v jednom případě také úsek kódující štěpící místo pro TEV proteasu sloužící k následnému odštěpení kotvy.

Upravený insert byl ligován do plasmidu pCW a transformován do buněk *E. coli* XL10 gold, ve kterých byl namnožen. Po ověření přípravy cíleného konstruktu štěpením restričními endonukleasami a následnou agarosovou elektroforesou byl vektor znovu transformován do buněk XL10 gold za účelem jeho amplifikace a vytvoření zásob na budoucí pokusy. U získaného plasmidu byla stanovena jeho koncentrace a čistota. Izolovaný plasmid byl pak odeslán na sekvenační analýzu. Takto ověřený plasmid byl poté použit k expresním pokusům.

Expres obou forem cytochromů probíhala v buňkách DH5 α , jejichž „overnight“ kulturou bylo inokulováno TB medium. V kultuře narostlé na požadovanou optickou denzitu byla zahájena exprese proteinu. Po dosažení koncentrace cytochromu P450 vyšší než 300 nmo/l byla narostlá kultura sklizena centrifugací a použita pro izolaci cytochromu P450 1B1.

Purifikovaný protein byl zahuštěn, alikvotován, charakterizován a zamražen. Ke druhé formě proteinu se štěpícím místem pro TEV proteasu byla po purifikačních krocích přidána TEV proteasa a směs byla ponechána reagovat. Protein bez histidinové kotvy byl purifikován pomocí afinitní chromatografie a následně taktéž zahuštěn, alikvotován, charakterizován a zamražen.

4.2.1 Charakterizace vektoru

Pro přípravu CYP1B1 byl použit konstrukt 1B1/pOTB7 (Obrázek 14) získaný z databanky plasmID [125].

```

5-
GGGAGCGAGCGCTTCTGCGACTCCAGTTGTGAGAGCCGCAAGGGCATGGAATTGACGCCACTCACCGACCCC
CAGTCTCAATCTCAACGCTGTGAGGAAACCTCGACTTTGCCAGGTCCCAAGGGCAGCGGGGCTCGGCGAGCG
AGGCACCCTTCTCCGTCCCCATCCCAATCCAAGCGCTCCTGGCACTGACGACGCCAAGAGACTCGAGTGGGAG
TTAAAGCTTCCAGTGAGGGCAGCAGGTGTCCAGGCCGGGCTGCGGGTTCCTGTTGACGTCTTGCCCTAGGCA
AAGGTCCCAGTTCCTTCTCGGAGCCGGCTGTCCCGCGCCACTGGAAACCGCACCTCCCCGAGCATGGGCACC
AGCCTCAGCCCGAAGCAGCCTTGGCGCTAAACCGCTGTCCATCCAGCAGACCAGCTCCTGCTACTCCTGT
CGGTGCTGGCCACTGTGCATGTGGGCCAGCGGTGCTGAGGCAACGGAGGCGGCAGCTCCGGTCCGGCCCCC
GGGCCCGTTTGCCTGGCCACTGATCGGAAACGCGGCGGCGGTGGGCCAGGCGGCTCACCTCTCGTTGCTCGC
CTGGCGCGGCGCTACGGCGACGTTTTCCAGATCCGCTGGGCAGCTGCCCATAGTGGTGCTGAATGGCGAGC
GCGCCATCCACAGGCCCTGGTGAGCAGGGCTCGGCCCTCGCCGACCGGCCCGGCCCTCGCCTCCTTCGGTGT
GGTGTCCGGCGGCGCAGCATGGCTTTCCGCCACTACTCGGAGCACTGGAAGGTGCAGCGGCGCGCAGCCCAC
AGCATGATGCGCAACTTCTTACGCGCCAGCCGCGCAGCCGCCAAGTCTCGAGGGCCACGTGCTGAGCGAGG
CGCGCAGCTGGTGGCGCTGCTGGTGCGCGGCAGCGCGGACGGCGCTTCTCGACCCGAGGCGCGCTGACGCT
CGTGGCGCTGGCCAAAGTCTGAGTGCCGTGTGTTTCGGCTGCGCTACAGCCAGCAGCAGCCGAGTTCGCT
GAGCTGCTCAGCCACAACGAAGAGTTTCGGGCGCACGGTGGGCGCGGGCAGCCTGGTGGACGTGATGCCCTGGC
TGCAGTACTTCCCCAACCAGGTGCGCACGTTTTTCGCGAATTGAGCAGCTCAACCGCAACTTCAGCAACTT
CATCCTGGACAAGTTCTTGAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCGGGGCGCCCCCGGACATGATGGACGCC
TTTATCCTCTCTGCGGAAAAGAAGGCGCGCGGGGACTCGCACGGTGGTGGCGCGGGCTGGATTTGGAGAAGC
TACCGGCCACTATCACTGACATCTTGGGCGCAGCCAGGACACCTGTCCACCGCGCTGCAGTGGCTGCTCCT
CCTCTTACCAGGTATCCTGATGTGCAGACTCGAGTGACGGCAGAATTGGATCAGGTCGTGGGGAGGGACGCT
CTGCCCTTGTATGGGTGACCAGCCCAACCTGCCCTATGTCTGGCCTTCTTTATGAAGCCATGCGCTTCTCCA
GCTTTGTGCCTGTCACTATTCTCATGCCACCCTGCCAACACCTCTGTCTTGGGCTACCACATTCCAAGGA
CACTGTGGTTTTTGTCAACAGTGGTCTGTGAATCATGACCAAGTGAAGTGGCCTAACCCGGAGAAGCTTTGAT
CCAGCTCGATTCTTGGACAAGGATGGCCTCATCAACAAGGACCTGACCAGCAGAGTGATGATTTTTTCAGTGG
GCAAAAGGCGGTGCATTGGCGAAGAAGTTTCAAGATGCAGCTTTTTCTCTTCATCTCCATCCTGGCTCACCA
GTGCGATTTTCAAGGCCAACCCCAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTAGTTATGGTCTAACCATTAACCCAAAG
TCATTTAAAGTCAATGTCACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGTGCTGTCCAAAATTTACAAGCCA
AGGAACTTGCCAATAAGAAGCAAGAGGCAAGCTGAAATTTAGAAATATTACATCTTCGGAGATGAGGAGT
AAAATTCAGTTTTTTTCCAGTTCCTCTTTGTGCTGCTTCTCAATTAGCGTTTAAAGTGAGCATAAATCAACT
GTCCATCAGGTGAGGTGTGCTCCATACCCAGCGGTCTTTCATGAGTAGTGGGCTATGCAGGAGCTTCTGGGAG
ATTTTTTTTGAGTCAAAGACTTAAAGGGCCCAATGAATTATTATATACATACTGCATCTTGGTTATTTCTGAAG
GTAGCATTTCTTTGGAGTTAAAATGCACATATAGACACATACACCCAAACACTTACACCAAACACTACTGAATGAA
GCAGTATTTTGGTAACAGGCCATTTTGGTGGGAATCCAAGATTGGTCTCCCATATGCAGAAATAGACAAAA
AGTATATTAAACAAAGTTTCAGAGTATATTGTTGAAGAGACAGAGACAAGTAATTTAGTGTAAGTGTGTGA
TTGAAGGTGATAAGGGAAAAGATAAAGACCAGAAATCCCTTTTACCTTTTTCAGGAAAATAACTTAGACTCT
AGTATTTATGGGTGGATTTATCCTTTTGCCTTCTGGTATACTTCTTACTTTTAAAGATAAATCATAAAGTCA
GTTGCTCAAAAAGAAATCAATAGTTGAATTAGTGAGTATAGTGGGTTCCATGAGTTATCATGAATTTTAAAG
TATGCATTATTAAATTGTAAACTCCAAGGTGATGTTGTACCTCTTTTGCTTGCCAAAGTACAGAATTTGAAT
TATCAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA -3

```

Obrázek 14 Insert obsahující mutantní gen pro cytochrom P450 1B1 vložený do plasmidu pOTB7. Mutace, při níž byl cytosin nahrazen guaninem je znázorněna modrou barvou. Kodón, jehož se mutace týká, je podbarven šedě.

Tento konstrukt byl izolován z buněk *E. coli* DH5α v rámci mé bakalářské práce [113]. U plasmidu, který byl poté použit jako templát pro PCR, byla pomocí

spektrofotometrického stanovení zjištěna jeho koncentrace a čistota již v mé bakalářské práci [113].

4.2.2 Amplifikace a úprava genů pro expresi CYP1B1

Pomocí polymerasové řetězové reakce byly připraveny dvě formy genů. Obě formy byly rozšířeny na obou svých koncích o místa pro restrikční endonukleasy a na 3'- konci o úsek DNA kódující histidinovou kotvu – forma CYP1B1-his (Obrázek 15). Druhá forma měla na 3'- konci přidaný navíc úsek DNA kódující štěpící místo pro TEV proteasu (ENLYFQG). Tento úsek byl vložen mezi úseky kódující štěpící místo pro restrikční endonukleasu a úsek kódující histidinovou kotvu – forma CYP1B1-T-his (Obrázek 16). U obou forem byly navíc odstraněny kodóny 2, 3 a 4 a kodóny 5 až 10 byly optimalizovány dle [112]. Tyto delece a optimalizace byly provedeny z důvodu vyšší exprese CYP1B1 [112].

5'-

GACGAATT **CATATG** CTTTCTCCAAATGATCCATGGCCGCTAAACCCGCTGTCCATCCAGCAG
 ACCACGCTCCTGCTACTCCTGTGCGTGCTGGCCACTGTGCATGTGGGCCAGCGGCTGCTGAG
 GCAACGGAGGCGGCAGCTCCGGTCCGCGCCCCCGGCCCGTTTGCCTGGCCACTGATCGGAA
 ACGCGGCGCGGCTGGGCCAGGCGGCTCACCTCTCGTTGCTCGCTGGCGCGGCGCTACGGC
 GACGTTTTCCAGATCCGCTGGGCAGCTGCCCCATAGTGGTGCTGAATGGCGAGCGCGCCAT
 CCACCAGGCCCTGGTGCAGCAGGGCTCGGCCTTCGCCGACCGGCCGGCCTTCGCCTCCTTCC
 GTGTGGTGTCCGGCGGCCGCAGCATGGCTTTCGGCCACTACTCGGAGCACTGGAAGGTGCAG
 CGGCGCGCAGCCACAGCATGATGCGCAACTTCTTCACGCGCCAGCCGCGCAGCCGCCAAGT
 CCTCGAGGGCCACGTGCTGAGCGAGGCGCGCAGCTGGTGGCGCTGCTGGTGCAGCGCAGCG
 CGGACGGCGCCTTCCTCGACCCGAGGCCGCTGACCGTCGTGGCCGTGGCCAACGTGATGAGT
 GCCGTGTGTTTCGGCTGCCGCTACAGCCACGACGACCCGAGTTCCGTGAGCTGCTCAGCCA
 CAACGAAGAGTTCCGGCGCACGGTGGGCGCGGGCAGCCTGGTGGACGTGATGCCCTGGCTGC
 AGTACTTCCCCAACCCGGTGCGCACCGTTTCCGCGAATTGAGCAGCTCAACCGCAACTTC
 AGCAACTTCATCCTGGACAAGTCTTGAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCGGGGCGCCCC
 CCGCGACATGATGGACGCCTTTATCCTCTCTGCGGAAAAGAAGGCGGCCGGGGACTCGCACG
 GTGGTGGCGCGCGGCTGGATTTGGAGAACGTACCGGCCACTATCACTGACATCTTCGGCGCC
 AGCCAGGACACCTGTCCACCGCGCTGCAGTGGCTGCTCCTCCTCTTCACCAGGTATCCTGA
 TGTGCAGACTCGAGTGCAGGCAGAATTGGATCAGGTCGTGGGGAGGGACCGTCTGCCTTGTA
 TGGGTGACCAGCCCAACCTGCCCTATGTCTGGCCTTCCTTTATGAAGCCATGCGCTTCTCC
 AGCTTTGTGCCTGTCACTATTCCTCATGCCACCACTGCCAACACCTCTGTCTTGGGCTACCA
 CATTTCCAAGGACACTGTGGTTTTTGTCAACCAGTGGTCTGTGAATCATGACCCAGTGAAGT
 GGCCTAACCCGGAGAACTTTGATCCAGCTCGATTCTTGGACAAGGATGGCCTCATCAACAAG
 GACCTGACCAGCAGAGTGATGATTTTTTTCAGTGGGCAAAAGGCGGTGCATTGGCGAAGAAGT
 TTCTAAGATGCAGCTTTTTCTCTTCATCTCCATCCTGGCTCACCAGTGCATTTTCAGGGCCA
 ACCCAAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTTCAGTTATGGTCTAACCATTAAACCCAAGTCATTT
 AAAGTCAATGTCACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGTGCTGTCCAAAATTTACA
 AGCCAAGGAACTTGCCAA**CATCATCATCATCATTAATGAAGCTTAGATA** -3'

Obrázek 15 Upravená sekvenční mutančního genu pro cytochrom P450 1B1 pomocí PCR – forma s označením CYP1B1-his.

Přidaná restrikční místa na 5'- konci EcoRI, resp. NdeI jsou na obrázku označena fialovou barvou, resp. zeleným pozadím. Na 3'- konci je místo pro restrikční endonukleasu HindIII označeno hnědou barvou. Úsek kódující histidinovou kotvu je označen černě.

Část genu, kde byla provedena optimalizace kodónu je na obrázku vyznačena červenou barvou, zvýrazněna tučně a podtržena.

Mutace, při níž byl cytosin nahrazen guaninem je znázorněna modrou barvou. Kodón, jehož se mutace týká je podbarven šedě.

5'-

GACGAATT **CATATG** CTTTCTCCAAATGATCCATGGCCGCTAAACCCGCTGTCCATCCAGCAG
 ACCACGCTCCTGCTACTCCTGTGCGTGCTGGCCACTGTGCATGTGGGCCAGCGGCTGCTGAG
 GCAACGGAGGCGGCAGCTCCGGTCCGCGCCCCGGGCCCGTTTGCCTGGCCACTGATCGGAA
 ACGCGGCGGGCGGTGGGCCAGGCGGCTCACCTCTCGTTGCTCGCCTGGCGCGGCGCTACGGC
 GACGTTTTCAGATCCGCTGGGCAGCTGCCCCATAGTGGTGCTGAATGGCGAGCGCGCCAT
 CCACCAGGCCCTGGTGCAGCAGGGCTCGGCCTTCGCCGACCGGCCGGCCTTCGCCTCCTTCC
 GTGTGGTGTCCGGCGGCCGCAGCATGGCTTTCGGCCACTACTCGGAGCACTGGAAGGTGCAG
 CGGCGCGCAGCCACAGCATGATGCGCAACTTCTTACGCGCCAGCCGCGCAGCCGCCAAGT
 CCTCGAGGGCCACGTGCTGAGCGAGGCGCGCAGCTGGTGGCGCTGCTGGTGCGCGGCAGCG
 CGGACGGCGCCTTCCTCGACCCGAGGCCGCTGACCGTCGTGGCCGTGGCCAACGTGATGAGT
 GCCGTGTGTTTCGGCTGCCGCTACAGCCACGACGACCCCGAGTCCGTGAGCTGCTCAGCCA
 CAACGAAGAGTTCCGGCGCACGGTGGGCGCGGGCAGCCTGGTGGACGTGATGCCCTGGCTGC
 AGTACTTCCCCAACC CGGTGCGCACCGTTTTCGCGGAATTGAGCAGCTCAACCGCAACTTC
 AGCAACTTCATCCTGGACAAGTCTTGAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCCGGGGCCGCCCC
 CCGCGACATGATGGACGCCTTTATCCTCTCTGCGGAAAAGAAGGCGGCCGGGGACTCGCACG
 GTGGTGGCGCGCGGCTGGATTTGGAGAACGTACCGGCCACTATCACTGACATCTTCGGCGCC
 AGCCAGGACACCTGTCCACCGCGCTGCAGTGGCTGCTCCTCCTCTTCACCAGGTATCCTGA
 TGTGCAGACTCGAGTGCAGGCAGAATTGGATCAGGTGCTGGGGAGGGACCGTCTGCCTTGTA
 TGGGTGACCAGCCCAACCTGCCCTATGTCTTGGCCTTCCTTTATGAAGCCATGCGCTTCTCC
 AGCTTTGTGCCTGTCACTATTCCTCATGCCACCACTGCCAACACCTCTGTCTTGGGCTACCA
 CATTCCCAAGGACACTGTGGTTTTTGTCAACCAGTGGTCTGTGAATCATGACCCAGTGAAGT
 GGCCTAACCCGGAGAACTTTGATCCAGCTCGATTCTTGGACAAGGATGGCCTCATCAACAAG
 GACCTGACCAGCAGAGTGATGATTTTTTTCAGTGGGCAAAAGGCGGTGCATTGGCGAAGAACT
 TTCTAAGATGCAGCTTTTCTCTTCATCTCCATCCTGGCTCACCAGTGCGATTTTCAGGGCCA
 ACCCAAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTTCAGTTATGGTCTAACCATTAAACCCAAAGTCATTT
 AAAGTCAATGTCACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGTGCTGTCCAAAATTTACA
 AGCCAAGGAACTTGCCAAGAAACTTGTATTTCCAGGGCCATCATCATCATCATCATTAAT
 GAAGCTTAGATA -3'

Obrázek 16 Upravená sekvence genu pro cytochromu P450 1B1 pomocí PCR - forma s označením CYP1B1-T-his.

Přidaná restriční místa na 5'- konci EcoRI, resp. NdeI jsou na obrázku označena fialovou barvou, resp. zeleným pozadím. Na 3'- konci je místo pro restriční endonukleasu HindIII označeno hnědou barvou. Úsek kódující histidinovou kotvu je označen černě, úsek kódující štěpící místo pro TEV proteasu je označeno zeleně.

Část genu, kde byla provedena optimalizace kodónu je na obrázku vyznačena červenou barvou, zvýrazněna tučně a podtržena.

Mutace, při níž byl cytosin nahrazen guaninem je znázorněna modrou barvou. Kodón, jehož se mutace týká je podbarven šedě.

U obou insertů je v bázi číslo 1294 přítomna mutace, kde je místo cytosinu přítomen guanin. Výsledkem mutace je změna ve 432. kodónu. V tomto kodónu nahrazuje aminokyselina valin aminokyselinu leucin. Tato mutantní forma proteinu ovšem v celosvětovém měřítku převažuje, naopak je tomu pouze u afrických národů [126]. Protože mají obě aminokyseliny podobnou strukturu i charakter, není mutace signifikantní, a tak nebyla provedena její úprava.

PCR reakční směs byla purifikována pomocí komerčního kitu. Purifikované PCR produkty byly stanoveny spektrofotometricky (Tabulka 5) a pomocí agarosové elektroforesy (Obrázek 17).

Tabulka 5 Spektrofotometrické stanovení PCR produktů.

	CYP1B1-T-his	CYP1B1-his
A_{260}	0,015	0,016
A_{280}	0,008	0,009
A_{320}	0,000	0,001
$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	1,88	1,88
c_{DNA} [$\mu\text{g/ml}$]	113	113
V_{DNA} [μl]	20	20



Obrázek 17 Agarosová elektroforesa PCR produktů.

Dráha 6: DNA marker.

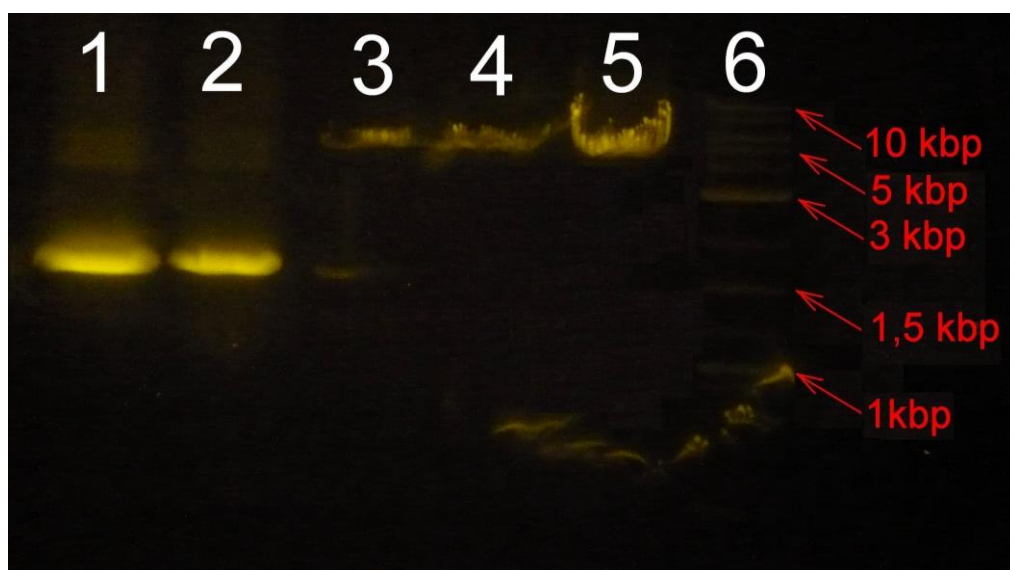
Dráha 7: Neštěpený produkt PCR – forma CYP1B1-T-his.

Dráha 8: Neštěpený produkt PCR – forma CYP1B1- his.

4.2.3 Vkládání insertu do plasmidu pCW

Oba inserty, upraveny pomocí polymerasové řetězové reakce, a plasmid pCW byly štěpeny restrikcčními endonukleasami NdeI a HindIII.. Štěpené směsi DNA byly následně

rozděleny pomocí agarosové elektroforesy (Obrázek 18). Štěpená DNA byla poté z agarosového gelu izolována a spektrofotometricky stanovena (Tabulka 6).



Obrázek 18 Agarosová elektroforesa štěpených vzorků DNA.

Dráha 1: Štěpený produkt PCR – forma CYP1B1-T-his.

Dráha 2: Štěpený produkt PCR – forma CYP1B1-his.

Dráha 3: Štěpený plasmid pCW.

Dráha 4: Štěpený plasmid pCW.

Dráha 5: Štěpený plasmid pCW.

Dráha 6: DNA marker.

Pozn.: Vzorky z drah 3 až 5 byly při izolaci z gelu sloučeny.

Tabulka 6 Spektrofotometrické stanovení DNA po izolaci z gelu.

	CYP1B1-T-his	CYP1B1-his	pCW
A_{260}	0,009	0,009	0,004
A_{280}	0,005	0,005	0,003
A_{320}	0,000	0,001	0,000
$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	1,80	2,00	1,33
$c_{DNA} [\mu g/ml]$	45,5	40,4	20,2
$V_{DNA} [\mu l]$	16	16	16
$m_{DNA} [\mu g]$	0,728	0,646	0,323
$n_{DNA} [\mu mol]$	$7,21 \cdot 10^{-7}$	$6,48 \cdot 10^{-7}$	$1,08 \cdot 10^{-7}$
$c_{DNA} [\mu mol/ml]$	$4,51 \cdot 10^{-5}$	$4,05 \cdot 10^{-5}$	$6,75 \cdot 10^{-6}$

Insert a plasmid byly smíchány v molárním poměru 13,4 : 1 v případě formy CYP1B1-T-his, resp. v poměru 12 : 1 v případě formy CYP1B1-his a ponechány ligovat. Po ukončení ligace byla směs transformována do buněk *E. coli* XL10 gold a vyseta na agarové plotny v Petriho miskách s ampicilinem.

Na obou plotnách byly vybrány tři kolonie, které byly metodou „single cell“ přeočkovány do 10 ml LB media s ampicilinem.

4.2.4 Izolace konstruktů 1B1/pCW a jeho ověření

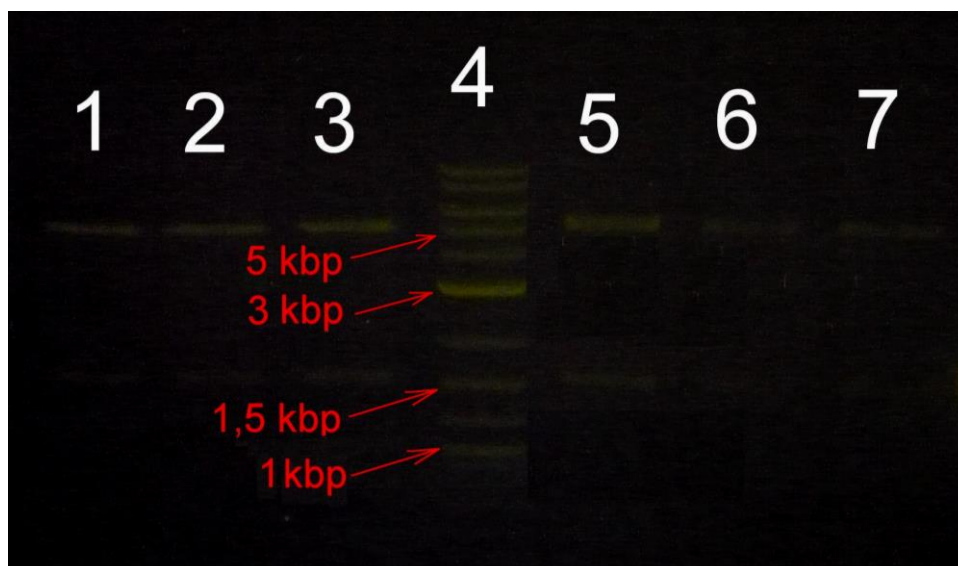
Z narostlé „overnight“ kultury byly pro ověření a následnou expresi proteinu izolovány dva typy konstruktů na bázi plasmidu pCW. První typ měl obsahovat lidský gen pro cytochrom P450 1B1 prodloužený o histidinovou kotvu na jeho C-konci. Druhý typ měl být navíc rozšířen o štěpící místo pro TEV proteasu, jenž by se mělo nacházet mezi genem pro cytochrom P450 1B1 a histidinovou kotvou. Důvodem přidání tohoto štěpícího místa do plasmidu je pokus o následné odštěpení histidinové kotvy a získu samotného proteinu.

Po izolaci konstruktů pomocí alkalické lyze následované fenol-chloroformovou extrakcí byl ze získaných plasmidů odebrán vzorek pro spektrofotometrické stanovení (Tabulka 7) a kontrolní štěpení (Obrázek 19).

Tabulka 7 Spektrofotometrické stanovení DNA konstruktů na bázi pCW.

	CYP1B1 -T-his1	CYP1B1 -T-his2*	CYP1B1 -T-his3	CYP1B1 -his1	CYP1B1 -his2*	CYP1B1 -his3
A ₂₆₀	0,019	0,012	0,013	0,016	0,013	0,010
A ₂₈₀	0,011	0,007	0,007	0,007	0,007	0,005
A ₃₂₀	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000
$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	1,88	2,2	2	2,5	2	2
C _{DNA} [μg/ml]	86	56	61	76	61	51
V _{DNA} [μl]	20	20	20	20	20	20

Pozn.: Vzorky konstruktů označeny * byly vybrány pro další transformaci.



Obrázek 19 Agarosová elektroforesa konstruktů po kontrolním štěpení.

Dráha 1: Štěpený konstrukt CYP1B1-his1/pCW.

Dráha 2: Štěpený konstrukt CYP1B1-his2/pCW.

Dráha 3: Štěpený konstrukt CYP1B1-his3/pCW.

Dráha 4: DNA marker

Dráha 5: Štěpený konstrukt CYP1B1-T-his1/pCW.

Dráha 6: Štěpený konstrukt CYP1B1-T-his2/pCW.

Dráha 7: Štěpený konstrukt CYP1B1-T-his3/pCW.

Kontrolní štěpení bylo prováděno pomocí restriční endonukleasy NcoI. Tento enzym má v genu pro CYP1B1 obsažena dvě štěpicí místa. Tato místa jsou od sebe vzdálená 1581 bp.

Z Obrázek 19 je patrné, že všechny vybrané „single cell“ kolonie v sobě obsahovaly fragment odpovídající svou velikostí konstruktů. Dle hodnot z Tabulka 7 byl z obou typů konstruktů vybrán jeden, který byl transformován dle stejného protokolu, podle kterého byl sám transformován do buněk, z nichž byl poté izolován.

Z narostlé „overnight“ kultury byly izolovány konstrukty (Tabulka 8), které byly stanoveny pomocí spektrofotometrického měření. Dle naměřených hodnot byl od každého typu konstruktů vybrán jeden vzorek, jenž byl poté odeslán na kontrolu správnosti prováděnou pomocí sekvenční reakce.

Tabulka 8 Spektrofotometrické stanovení konstruktů na bázi pCW po opětovné transformaci.

	CYP1B1- T-his2a	CYP1B1- T-his2b	CYP1B1- T-his2c *	CYP1B 1-his2a	CYP1B 1-his2b *	CYP1B 1-his2c
A ₂₆₀	0,111	0,092	0,123	0,111	0,084	0,103
A ₂₈₀	0,068	0,051	0,074	0,070	0,052	0,064
A ₃₂₀	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$	1,65	1,82	1,67	1,59	1,62	1,62
c _{DNA} [μg/ml]	550	460	616	555	420	515
V _{DNA} [μl]	20	20	20	20	20	20

Pozn.: Vzorky konstruktů označeny * byly vybrány pro sekvenační reakci a následnou expresi proteinu.

Správnost obou připravených konstruktů byla sekvenační reakcí potvrzena. Tyto konstrukty byly následně amplifikovány. Po izolaci byly získané konstrukty uloženy do -80 °C.

4.2.5 Exprese cytochromu P450 1B1 vektorem na bázi pCW

Vektory verifikované sekvenační reakcí byly použity k expresi lidského cytochromu P450 1B1 nejprve v menším množství média. Výsledky této pokusné exprese měly za úkol určit kmen buněk, ve kterých bude probíhat exprese ve větším množství média a její přibližné trvání.

Cílem exprese ve větším množství média pak bylo, aby vybraný bakteriální kmen naprodukoval pokud možno co nejvíce aktivního cytochromu P450 1B1, jenž byl následně z bakterií izolován.

4.2.5.1 Testovací exprese

K testovací expresi byly vybrány dva buněčné kmeny. *E. coli* – DH5α a XL10 gold. Do kmene DH5α byl transformován verifikovaný konstrukt, zmražený glycerolový alikvot buněk XL10 gold, jenž byl odebrán před izolací konstruktů, již v sobě verifikovaný konstrukt obsahoval.

Modifikované TB medium bylo inokulováno 2 ml „multi cell“ kultury kmene DH5 α , resp. glycerolovým alikvotem kmene XL10 gold. Buňky v mediu byly ponechány růst při 37 °C a 220 RPM v modifikovaném TB mediu do optické denzity OD₆₀₀ = 0,6 -1,0.

Po dosažení požadovaného intervalu optické denzity byly ke kultuře přidány IPTG a kyselina δ -aminolevulová. Teplota, resp. otáčky byly sníženy na 32 °C, resp. 200 RPM. Expres proteinu byla sledována po dobu 48 h (Tabulka 9 a Tabulka 10).

Tabulka 9 Testovací exprese cytochromu P450 1B1, formy s označením CYP1B1hm, z plasmidu CYP1B1-his2b/pCW.

	CYP1B1hm					
	Kmen DH5 α			Kmen XL10 gold		
Čas [h]	OD ₆₀₀	CP450 [nmol/l]	CP420 [nmol/l]	OD ₆₀₀	CP450 [nmol/l]	CP420 [nmol/l]
2,00	0,300	-	-	0,017	-	-
3,25	-	-	-	-	-	-
4,25	0,868	INDUKCE		-	-	-
5,75	-	-	-	0,158	-	-
10,75	-	-	-	0,565	INDUKCE	
34,75	-	280	703	-	14	340
58,75	-	1486	3841	-	nedetekováno	neměřitelné

Tabulka 10 Testovací exprese cytochromu P450 1B1, formy s označením CYP1B1thm, z plasmidu CYP1B1-T-his2c/pCW.

	CYP1B1thm					
	Kmen DH5 α			Kmen XL10 gold		
Čas [h]	OD ₆₀₀	Cp450 [nmol/l]	Cp420 [nmol/l]	OD ₆₀₀	Cp450 [nmol/l]	Cp420 [nmol/l]
2,00	-	-	-	-	-	-
3,25	0,566	-	-	0,028	-	-
4,25	0,891	INDUKCE		-	-	-
6,00	-	-	-	-	-	-
10,75	-	-		0,765	INDUKCE	
34,75	-	143	539	-	43	586
58,75	-	143*	375*	-	nedetekováno	1499

Pozn.: U hodnot údajů v Tabulka 10 označených * může být jejich hodnota ještě vyšší. Hodnota uvedená v Tabulka 10 udává pouze minimální koncentraci cytochromu ve vzorku. Tato hodnota byla odečtena z grafu, jehož část byla zaznamenána přístrojem.

Jak je patrné z Tabulka 9 a Tabulka 10, exprese obou forem proteinu probíhala lépe v kmeni DH5 α , a tak byl pro expresi vybrán tento buněčný kmen. Výsledky z Tabulka 9 a Tabulka 10 také ukazují, že z hlediska rychlosti růstu buněk je výhodnější použít „multi cell“ či „single cell“ „overnight“ kulturu.

4.2.5.2 Expresa proteinů ve větším množství media

Oba konstrukty byly transformovány do buněk *E. coli* DH5 α . Z narostlých „single cell“ kolonií byla připravena „overnight“ kultura.

Produkce obou forem lidského cytochromu P450 1B1 byla prováděna ve 4 l modifikovaného TB media, rozdělených po 500 ml. Po nárůstu kultury na požadovanou optickou denzitu, cca OD₆₀₀ = 2, byla indukována syntéza proteinu pomocí IPTG a kyseliny δ -aminolevulové. Během růstu a následné produkce byly průběžně sledovány hodnoty koncentrace cytochromu P450 a optické denzity OD₆₀₀ (Tabulka 11 a Tabulka 12).

Tabulka 11 Expresce cytochromu P450 1B1, formy s označením CYP1B1hm, z plasmidu CYP1B1-his2b/pCW ve větším množství media.

	CYP1B1hm		
Čas [h]	OD ₆₀₀	c _{P450} [nmol/l]	Podmínky
0,00	-	-	32 °C / 200 RPM
8,00	0,588	-	-
10,00	1,408	-	-
12,30	2,048	-	INDUKCE
25,25	2,960	-	-
26,75	-	61	-
34,00	-	110	-
48,50	4,010	308	konec produkce

Tabulka 12 Expresce cytochromu P450 1B1, formy s označením CYP1B1thm, z plasmidu CYP1B1-T-his2c/pCW ve větším množství media.

	CYP1B1thm		
Čas [h]	OD ₆₀₀	c _{P450} [nmol/l]	Podmínky
0,00	-	-	30 °C / 200 RPM
3,00	-	-	37 °C / 220 RPM
8,50	1,044	-	-
9,50	-	-	30 °C / 200 RPM
12,25	1,840	-	INDUKCE
24,75	3,264	593	konec produkce

Z Tabulka 11 a Tabulka 12 je patrné, že optická denzita OD₆₀₀ roste při produkci obou forem proteinu přibližně stejnou rychlostí. Koncentrace cytochromu P450 roste ale rychleji v případě produkce proteinu z plasmidu, ve kterém je vložený gen rozšířený o úsek kódující štěpící místo pro TEV proteasu, než z plasmidu, kde tento úsek chybí.

4.3 Izolace lidského cytochromu P450 1B1

Jakmile byla produkce proteinu ukončena, narostlá kultura byla centrifugována. Po následujícím resuspendování z ní byly připraveny sferoplasty, které byly sonikovány. Z

odděleného supernatantu byla připravena membránová frakce. Cytochrom P450 přítomný v membránové frakci byl ponechán solubilizovat. Ultracentrifugací získaný supernatant, jenž obsahoval solubilní formu cytochromu P450, byl nanesen na kolonu afinitní chromatografie, jejíž pomocí byl izolován a purifikován.

Získaný roztok obsahující protein formy CYP1B1^{hm} byl purifikován pomocí dialyzační trubice, zahuštěn, alikvotován a charakterizován.

V případě formy CYP1B1^{thm} obsahující štěpící místo pro TEV proteasu byla k protein obsahujícímu roztoku přidána TEV proteasa. Tato směs byla ponechána reagovat v dialyzační trubici. Po dialýze byl dialyzát nanesen na kolonu afinitní chromatografie, ze které byl následně uvolněn protein bez histidinové kotvy s označením CYP1B1^m.

Aminokyselinové sekvence všech tří proteinových forem jsou níže porovnány s přirozenou formou cytochromu P450 1B1 (CYP1B1^{wt}), se kterou je porovnávána také sekvence původně obdrženého insertu přepsaná do aminokyselinové sekvence (CYP1B1^{wk}) (Obrázek 20).

CYP1B1 ^{wt}	1	MGTSLSPNDFWPLNPLSIQQTTLLLLLSVLATVHVGQRLL	40
CYP1B1 ^{wk}	1	MGTSLSPNDFWPLNPLSIQQTTLLLLLSVLATVHVGQRLL	40
CYP1B1 ^{hm}	1	M---LSPNDFWPLNPLSIQQTTLLLLLSVLATVHVGQRLL	40
CYP1B1 ^{thm}	1	M---LSPNDFWPLNPLSIQQTTLLLLLSVLATVHVGQRLL	40
CYP1B1 ^m	1	M---LSPNDFWPLNPLSIQQTTLLLLLSVLATVHVGQRLL	40
CYP1B1 ^{wt}	41	RQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAAVGQAAHLSFARLARR	80
CYP1B1 ^{wk}	41	RQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAAVGQAAHLSFARLARR	80
CYP1B1 ^{hm}	41	RQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAAVGQAAHLSFARLARR	80
CYP1B1 ^{thm}	41	RQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAAVGQAAHLSFARLARR	80
CYP1B1 ^m	41	RQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAAVGQAAHLSFARLARR	80
CYP1B1 ^{wt}	81	YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSADFADRPAPF	120
CYP1B1 ^{wk}	81	YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSADFADRPAPF	120
CYP1B1 ^{hm}	81	YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSADFADRPAPF	120
CYP1B1 ^{thm}	81	YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSADFADRPAPF	120
CYP1B1 ^m	81	YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSADFADRPAPF	120
CYP1B1 ^{wt}	121	ASFRVVS GGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSM MRNFFTRQP	160
CYP1B1 ^{wk}	121	ASFRVVS GGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSM MRNFFTRQP	160
CYP1B1 ^{hm}	121	ASFRVVS GGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSM MRNFFTRQP	160
CYP1B1 ^{thm}	121	ASFRVVS GGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSM MRNFFTRQP	160
CYP1B1 ^m	121	ASFRVVS GGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSM MRNFFTRQP	160

CYP1B1wt	161	RSRQVLEGHVLSEARELVALLVRGSADGAFLDPRPLTVVA	200
CYP1B1wk	161	RSRQVLEGHVLSEARELVALLVRGSADGAFLDPRPLTVVA	200
CYP1B1hm	161	RSRQVLEGHVLSEARELVALLVRGSADGAFLDPRPLTVVA	200
CYP1B1thm	161	RSRQVLEGHVLSEARELVALLVRGSADGAFLDPRPLTVVA	200
CYP1B1m	161	RSRQVLEGHVLSEARELVALLVRGSADGAFLDPRPLTVVA	200
CYP1B1wt	201	VANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSL	240
CYP1B1wk	201	VANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSL	240
CYP1B1hm	201	VANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSL	240
CYP1B1thm	201	VANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSL	240
CYP1B1m	201	VANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSL	240
CYP1B1wt	241	VDVMPWLQYFPNPVRTVFREFEQLNRNFSNFILDKFLRHC	280
CYP1B1wk	241	VDVMPWLQYFPNPVRTVFREFEQLNRNFSNFILDKFLRHC	280
CYP1B1hm	241	VDVMPWLQYFPNPVRTVFREFEQLNRNFSNFILDKFLRHC	280
CYP1B1thm	241	VDVMPWLQYFPNPVRTVFREFEQLNRNFSNFILDKFLRHC	280
CYP1B1m	241	VDVMPWLQYFPNPVRTVFREFEQLNRNFSNFILDKFLRHC	280
CYP1B1wt	281	ESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENV	320
CYP1B1wk	281	ESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENV	320
CYP1B1hm	281	ESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENV	320
CYP1B1thm	281	ESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENV	320
CYP1B1m	281	ESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENV	320
CYP1B1wt	321	PATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAE	360
CYP1B1wk	321	PATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAE	360
CYP1B1hm	321	PATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAE	360
CYP1B1thm	321	PATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAE	360
CYP1B1m	321	PATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAE	360
CYP1B1wt	361	DQVVGRDRLPCM GDQPNLPYVLAFLYEAMRFSFVPVTIP	400
CYP1B1wk	361	DQVVGRDRLPCM GDQPNLPYVLAFLYEAMRFSFVPVTIP	400
CYP1B1hm	361	DQVVGRDRLPCM GDQPNLPYVLAFLYEAMRFSFVPVTIP	400
CYP1B1thm	361	DQVVGRDRLPCM GDQPNLPYVLAFLYEAMRFSFVPVTIP	400
CYP1B1m	361	DQVVGRDRLPCM GDQPNLPYVLAFLYEAMRFSFVPVTIP	400
CYP1B1wt	401	HATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENF	440
CYP1B1wk	401	HATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENF	440
CYP1B1hm	401	HATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENF	440
CYP1B1thm	401	HATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENF	440
CYP1B1m	401	HATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENF	440
CYP1B1wt	441	DPARFLDKDGLINKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQL	480
CYP1B1wk	441	DPARFLDKDGLINKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQL	480
CYP1B1hm	441	DPARFLDKDGLINKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQL	480
CYP1B1thm	441	DPARFLDKDGLINKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQL	480
CYP1B1m	441	DPARFLDKDGLINKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQL	480

CYP1B1wt	481	FLFISILAHQCDFRANPNNEPAKMNFSYGLTIKPKSFKVNV	520
CYP1B1wk	481	FLFISILAHQCDFRANPNNEPAKMNFSYGLTIKPKSFKVNV	520
CYP1B1hm	481	FLFISILAHQCDFRANPNNEPAKMNFSYGLTIKPKSFKVNV	520
CYP1B1thm	481	FLFISILAHQCDFRANPNNEPAKMNFSYGLTIKPKSFKVNV	520
CYP1B1m	481	FLFISILAHQCDFRANPNNEPAKMNFSYGLTIKPKSFKVNV	520
CYP1B1wt	521	TLRESMELLDSAVQNLQAKETCQ	543
CYP1B1wk	521	TLRESMELLDSAVQNLQAKETCQ	543
CYP1B1hm	521	TLRESMELLDSAVQNLQAKETCQHHHHHH	549
CYP1B1thm	521	TLRESMELLDSAVQNLQAKETCQENLYFQHHHHHH	556
CYP1B1m	521	TLRESMELLDSAVQNLQAKETCQENLYFQ	549

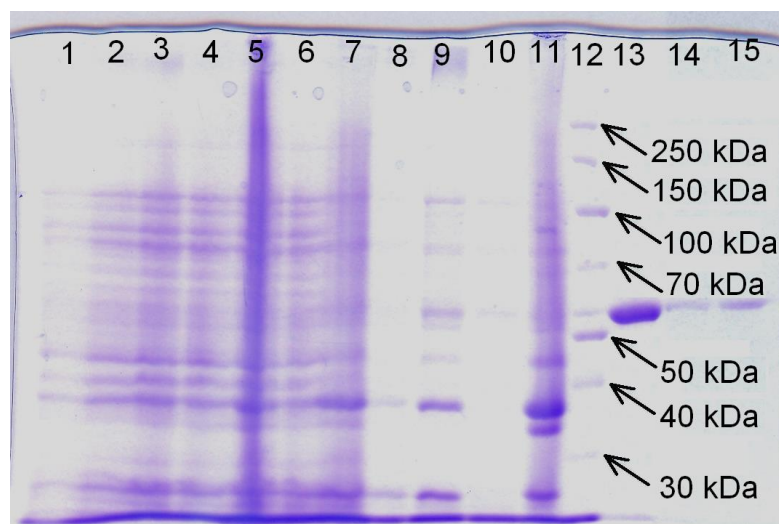
Obrázek 20 Porovnání proteinových sekvencí připravených proteinů – cytochromu P450 1B1 s histidinovou kotvou (CYP1B1hm), cytochromu P450 1B1 s histidinovou kotvou a štěpícím místem pro TEV proteasu (CYP1B1thm), cytochromu P450 1B1 po odštěpení histidinové kotvy (CYP1B1hm) s přirozeně se vyskytující sekvencí (CYP1B1wt) a sekvencí kódovanou původním plasmidem pOTB7 obdržným pro práci.

Na Obrázek 20 jsou pomlčkou označeny deletované aminokyseliny, růžově jsou podbarveny aminokyseliny u nichž došlo k optimalizaci kodónu. Žlutým podbarvením je znázorněna aminokyselina podlehlá mutaci L432V. Šedým podbarvením je znázorněna histidinová kotva a zeleným podbarvením štěpící úsek pro TEV proteasu.

Ačkoli obě formy proteinu obsahovaly ve svém genetickém kódu optimalizaci kodónu a měli deletovány 2. – 4. aminokyselinu, neliší se od přirozené formy téměř vůbec. Tuto skutečnost dokazuje porovnání proteinových sekvencí obou produktů s proteinovou sekvencí přirozené formy proteinu.

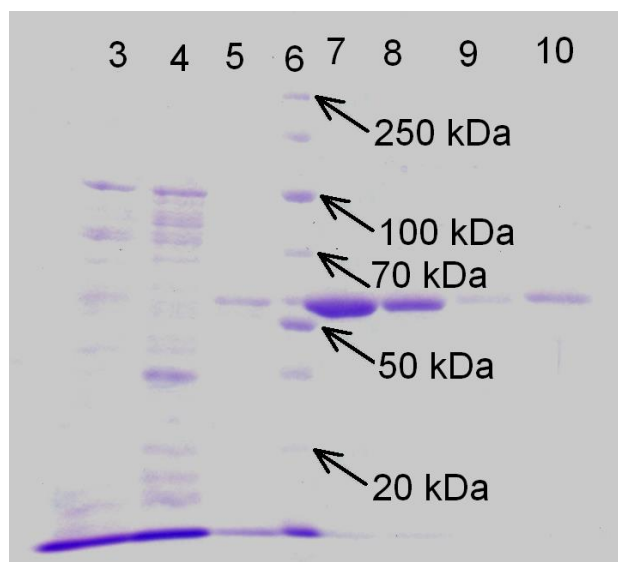
4.3.1 Izolace cytochromu P450 1B1 pomocí afinitní chromatografie a jeho purifikace

V průběhu izolace proteinu byly odebírány vzorky, jež byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy. Vzorky byly odebírány jak v případě izolace formy CYP1B1hm (Obrázek 21 a Obrázek 22), tak formy CYP1B1thm, resp. formy CYP1B1m (Obrázek 23 a Obrázek 24). Analýza odebraných vzorků byla prováděna za účelem zjištění orientačního množství cytochromu P450 ve vzorku vzhledem k ostatním proteinům. Na základě porovnání se vzorky odebranými v různých krocích lze také odhadovat ztráty v průběhu izolace. Díky těmto porovnáním vzorků lze určit například krok, ve kterém byly ztráty proteinu největší a na základě tohoto zjištění udělat či navrhnout opatření, která by těmto ztrátám v dalších izolacích měla zabránit.



Obrázek 21 SDS elektroforesa vzorků odebraných v průběhu izolace cytochromu P450 1B1 – formy CYP1B1hm – 1. část.

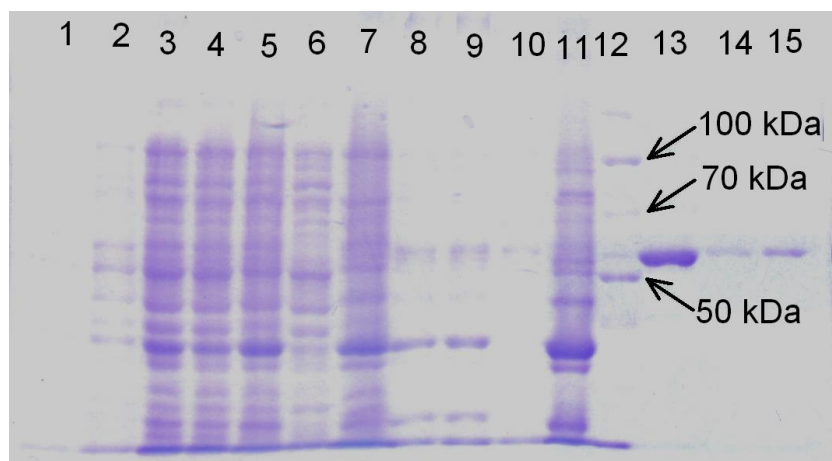
1) Buněčná kultura před indukcí 2) Buněčná kultura před sklizením 3) Sonikované sferoplasty 4) Supernatant ze sonikovaných sferoplastů 5) Peleta ze sonikovaných sferoplastů 6) Peleta z membránové frakce 7) Supernatant z membránové frakce 8) Resuspendovaná peleta z membránové frakce před solubilizací 9) Resuspendovaná peleta z membránové frakce po solubilizaci 10) Supernatant solubilizovaného cytochromu P450 11) Peleta solubilizovaného cytochromu P450 12) marker 13) CYP1B1hm – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 14) CYP1B1m – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 15) CYP1B1thm (izolace z první exprese) 10x ředěný.



Obrázek 22 SDS elektroforesa vzorků odebraných v průběhu izolace cytochromu P450 1B1 – formy CYP1B1hm – 2. část.

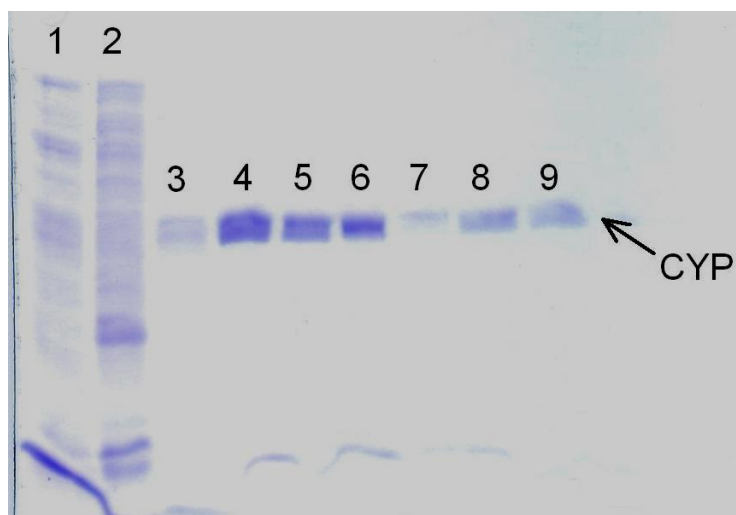
3) Eluát po nanesení solubilizovaného cytochromu P450 1B1 na kolonu afinitní chromatografie 4) Eluát po promytí pufrém WASH1 5) Eluát po promytí pufrém WASH2 6) marker 7) CYP1B1hm – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 8) CYP1B1hm (izolace z první exprese) 10x ředěný 9) CYP1B1m – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 10) CYP1B1thm (izolace z první exprese) 10x ředěný.

Z elektroforetických gelů na Obrázek 21 a Obrázek 22 lze vyčíst, že při izolaci cytochromu P450 1B1 formy CYP1B1_{hm} – 61 409 Da [127] se solubilizovaný protein z větší části navázal na kolonu. K výraznějším ztrátám došlo při promývání kolony pufrém WASH2. Porovnání velikosti izolované formy s formami získanými při jiných izolacích odpovídá teoretickým velikostem proteinů CYP1B1_{hm} – 62 261 Da [127] a CYP1B1_m – 61 382 Da [127].



Obrázek 23 SDS elektroforesa vzorků odebraných v průběhu izolace cytochromu P450 1B1 – formy CYP1B1_{hm}, resp. CYP1B1_m – 1. část.

1) Buněčná kultura před indukcí 2) Buněčná kultura před sklizením 3) Sonikované sferoplasty 4) Supernatant ze sonikovaných sferoplastů 5) Peleta ze sonikovaných sferoplastů 6) Peleta z membránové frakce 7) Supernatant z membránové frakce 8) Resuspendovaná peleta z membránové frakce před solubilizací 9) Resuspendovaná peleta z membránové frakce po solubilizaci 10) Supernatant solubilizovaného cytochromu P450 11) Peleta solubilizovaného cytochromu P450 12) marker 13) CYP1B1_{hm} – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 14) CYP1B1_m – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 15) CYP1B1_{hm} (izolace z první exprese) 10x ředěný.



Obrázek 24 SDS elektroforesa vzorků odebraných v průběhu izolace cytochromu P450 1B1 – formy CYP1B1thm, resp. CYP1B1m – 2. část.

1) Eluát po nanesení solubilizovaného cytochromu P450 1B1 na kolonu afinitní chromatografie 2) Eluát po promytí pufrém WASH1 3) Eluát po promytí pufrém WASH2 4) Cytochrom P450 uvolněný z kolony pufrém ELUTE 5) Cytochrom P450 uvolněný z kolony pufrém ELUTE po první dialýze (CYP1B1thm) 6) Cytochrom P450 uvolněný z kolony pufrém ELUTE po páté dialýze (směs CYP1B1thm a CYP1B1m) 7) CYP1B1m (finální produkt před zahuštěním) 8) CYP1B1 Eluát získaný promytím kolony pufrém WASH2* 9) CYP1B1 Eluát získaný promytím kolony pufrém ELUTE*.

Stanovení vzorků odebraných v průběhu izolace cytochromu P450 1B1 formy CYP1B1m – 61 382 Da [127] pomocí SDS-elektroforesy ukazuje (Obrázek 24), že v průběhu izolace proteinu došlo k velké ztrátě při promývání chromatografické kolony pufrém WASH2 (dráha 4). K další významné ztrátě došlo při uvolňování štěpeného proteinu z kolony (dráha 7), kde bylo pro úplné uvolnění proteinu třeba použít modifikované roztoky WASH2* (50 mmol/l imidazol) a ELUTE* (žádný CHAPS ani β -merkapt ethanol) (dráhy 8 a 9 na Obrázek 24). Porovnání velikostí naznačuje, že protein v dráze 9 má vyšší molární hmotnost než proteiny v dráhách 7 a 8. Z porovnání vzorků v dráhách 13 až 15 na Obrázek 23 je mezi molárními hmotnostmi analyzovaných vzorků také patrný rozdíl.

U získaného preparátu cytochromu P450 1B1 byla stanovena koncentrace cytochromu P450 a celkový obsah proteinu ve vzorku. Na základě těchto stanovení byla sestavena bilanční tabulka pro jednotlivé izolace (Tabulka 13 a Tabulka 14).

Tabulka 13 Bilanční tabulka pro izolaci cytochromu P450 1B1 formu CYP1B1^{hm}.

Frakce	m _{proteinu} [mg]	C _{proteinu} [mg/l]	n _{P450} [nmol]	C _{P450} [nmol/l]	n _{P420} [nmol]	C _{P420} [nmol/l]	specifický obsah [nmol/mg]
Bakterie ^a	45760	11440	1231	308	2378	595	0,0262
Membránová frakce	376	18810	109	5450	ND	ND	0,290
Solubilizát	364	1213	x	x	x	x	x
Finální preparát	6,42	1567	15,4	3760	ND	ND	2,40

ND daná forma nebyla při měření detekována

^a buněčná kultura před sklizením

x spektrum nebylo měřeno

Tabulka 14 Bilanční tabulka pro izolaci cytochromu P450 1B1 formu CYP1B1^m.

Frakce	m _{proteinu} [mg]	C _{proteinu} [mg/l]	n _{P450} [nmol]	C _{P450} [nmol/l]	n _{P420} [nmol]	C _{P420} [nmol/l]	specifický obsah [nmol/mg]
Bakterie ^a	50200	12550	2374	593	2162	541	0,0473
Membránová frakce	324	16180	282	14121	ND	ND	0,873
Solubilizát	247	823	584	1946	233	777	2,37
Dialýza 1 ^b	20,5	205	36,8	368	41,9	419	1,79
Dialýza 2-5 + štěpení ^c	15,5	182	69,6	819	47,5	559	4,50
Finální preparát	1,05	198	5,20	981	ND	ND	4,96

ND = daná forma nebyla při měření detekována

^a buněčná kultura před sklizením^b cytochrom P450 uvolněný z kolony pufrem ELUTE po první dialýze (CYP1B1^{thm})^c cytochrom P450 po druhé až páté dialýze před nanesením na kolonu niklové afinitní chromatografie (směs CYP1B1^{thm} a CYP1B1^m)

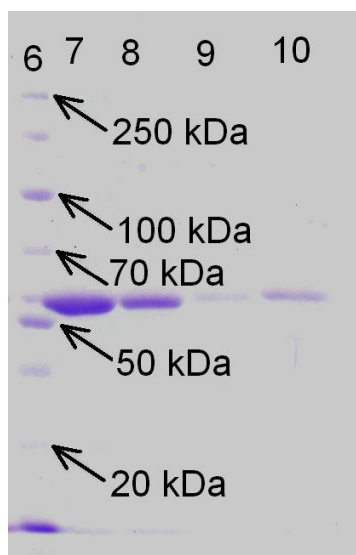
Tabulka 15 Bilanční tabulka pro izolaci cytochromu P450 1B1 formu CYP1B1m.

Frakce	m _{proteinu} [mg]	C _{proteinu} [mg/l]	n _{P450} [nmol]	C _{P450} [nmol/l]	n _{P420} [nmol]	C _{P420} [nmol/l]	specifický obsah [nmol/mg]
Finální preparát	-	-	14,4	2 879	14,5	2 955	-

Z hodnot v Tabulka 13 a Tabulka 14 vyplývá, že z hlediska výtěžku byla úspěšnější izolace formy CYP1B1hm, ačkoli specifický obsah cytochromu ve finálním preparátu byl vzhledem k formě CYP1B1m poloviční. Z Tabulka 15 je patrné, že ve vzorku mají obě formy cytochromu přibližně stejné zastoupení.

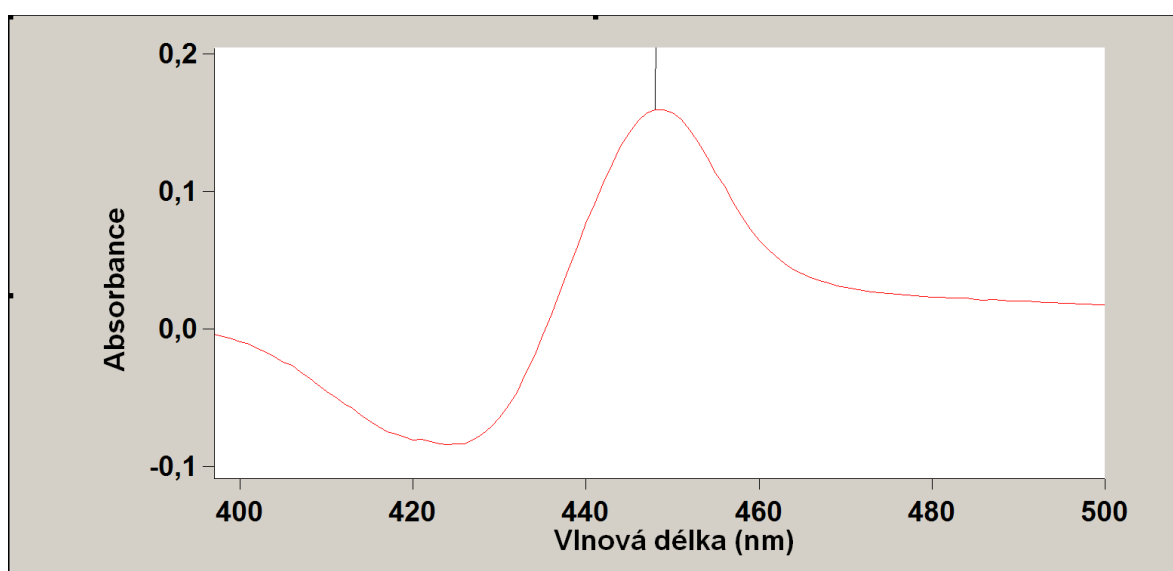
4.3.2 Charakterizace cytochromu P450 1B1

Čistota finálních preparátů byla sledována pomocí SDS elektroforesy (Obrázek 25). Na elektroforetickém gelu je patrný rozdíl mezi velikostmi analyzovaných vzorků v drahách 8 a 9 a drahách 9 a 10. Tato skutečnost spolu s faktem, že CYP1B1thm se po ošetření TEV proteasou již neváže na afinitní kolonu, potvrzuje úspěšné štěpení TEV proteasou při odštěpování histidinové kotvy.

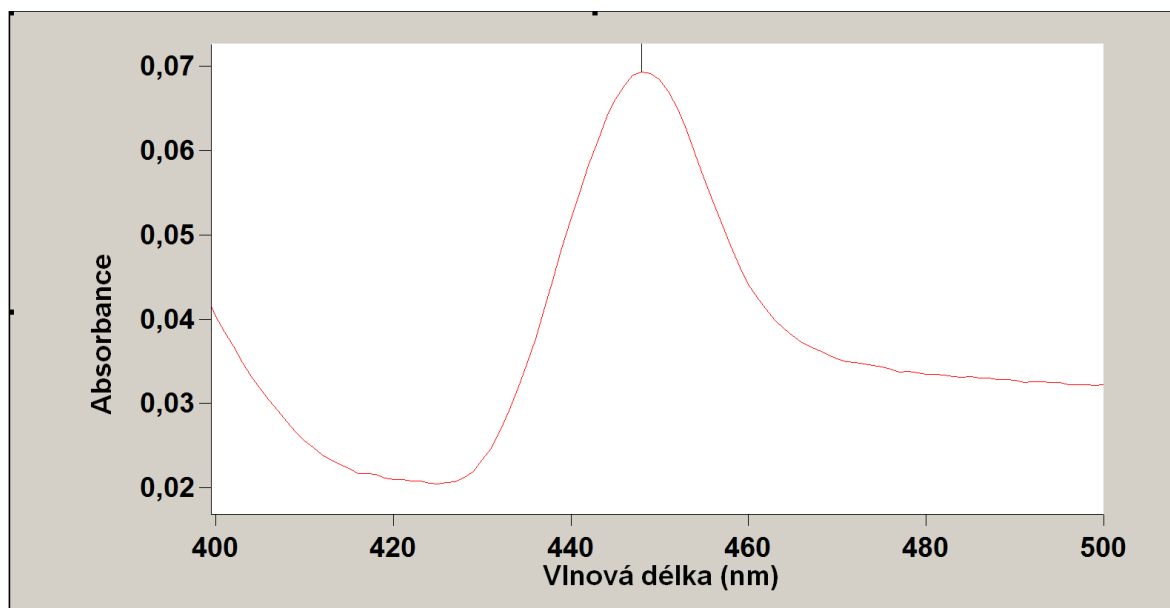
**Obrázek 25** SDS elektroforeza finálních preparátů.

6) Marker 7) CYP1B1hm – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 8) CYP1B1hm (izolace z první exprese) 10x ředěný 9) CYP1B1m – finální produkt (izolace z druhé exprese) 10x ředěný 10) CYP1B1thm (izolace z první exprese) 10x ředěný.

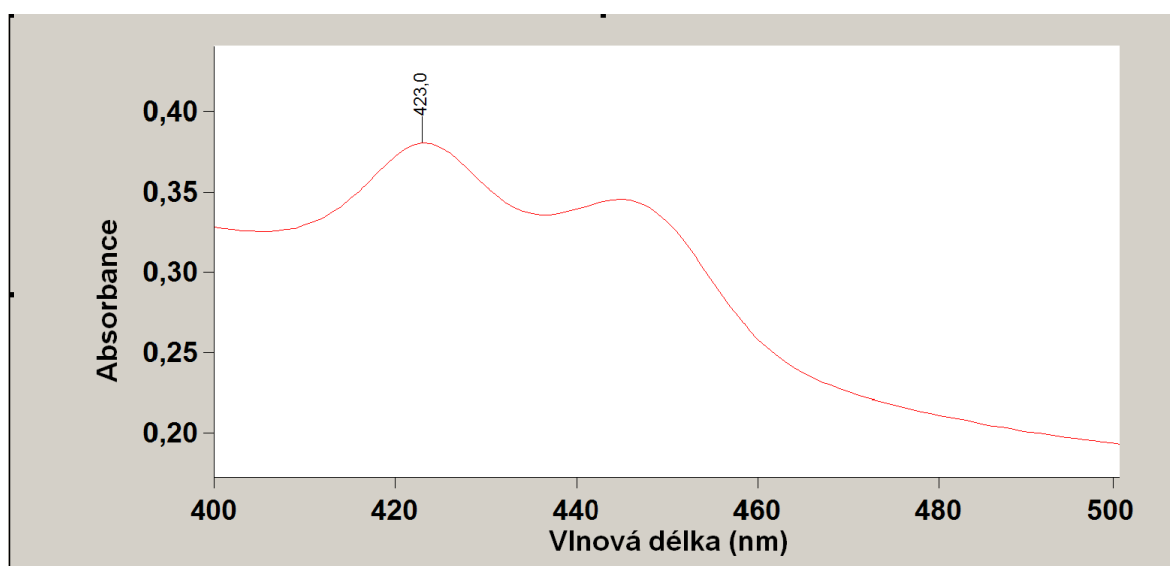
Na Obrázek 26 (forma CYP1B1hm) a Obrázek 27 (forma CYP1B1m) je znázorněno diferenční spektrum finálního preparátu cytochromu P450 1B1 změřené při stanovení celkového množství cytochromu P450 ve vzorku. Na základě těchto spekter byla spočtena koncentrace a celkové množství cytochromu P450 a cytochromu P420 ve vzorku. Tyto údaje jsou zaznamenány v Tabulka 13 (forma CYP1B1hm) a Tabulka 14 (forma CYP1B1m). Koncentrace neštěpené formy cytochromu P450 1B1 (Tabulka 15) byla spočtena na základě diferenčního spektra na Obrázek 28 (forma CYP1B1thm). Další stanovení u tohoto preparátu nebyla provedena, jelikož obsahoval nesprávně složenou formu cytochromu P420.



Obrázek 26 Spektrofotometrické stanovení finálního preparátu cytochromu P450 1B1 formy s označením CYP1B1hm.



Obrázek 27 Spektrofotometrické stanovení finálního preparátu cytochromu P450 1B1 formy s označením CYP1B1m.

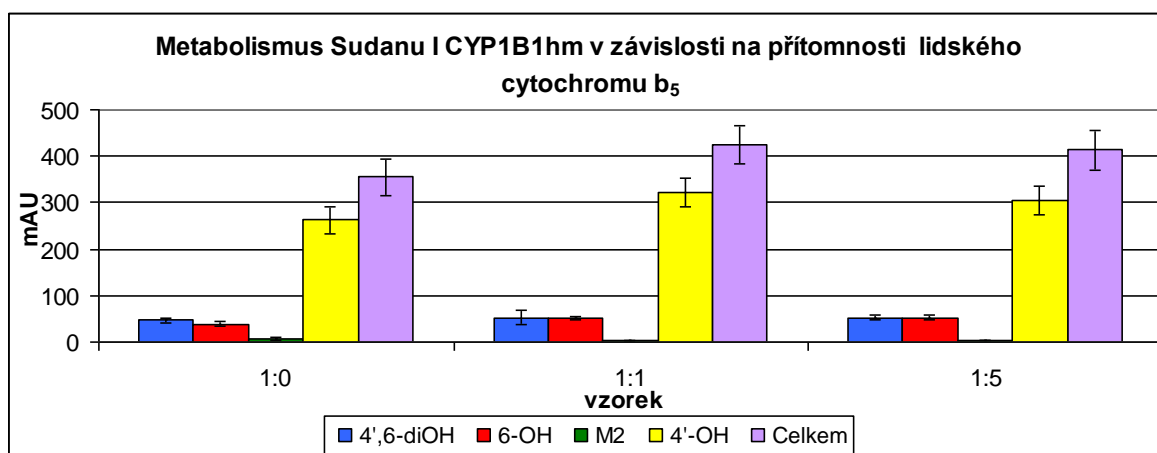


Obrázek 28 Spektrofotometrické stanovení cytochromu P450 1B1 formy s označením CYP1B1thm.

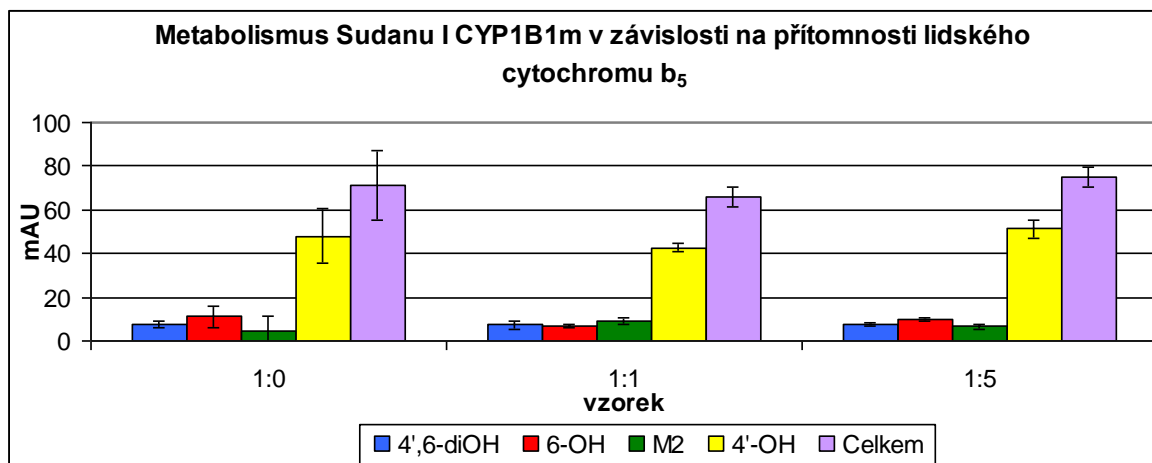
Spektrální charakteristiky i SDS elektroforesy ukazují, že finální preparáty CYP1B1hm i CYP1B1m jsou dostatečně čisté a zároveň neobsahují nesprávně složenou formu cytochrom P420. Ačkoli preparát CYP1B1thm dle stanovení SDS elektroforesou vykazuje dostatečnou čistotu, obsahuje příměs nesprávně složené formy cytochrom P420. Tato příměs tvoří přibližně polovinu množství cytochromu ve vzorku.

4.4 Stanovení metabolitů Sudanu I pomocí HPLC

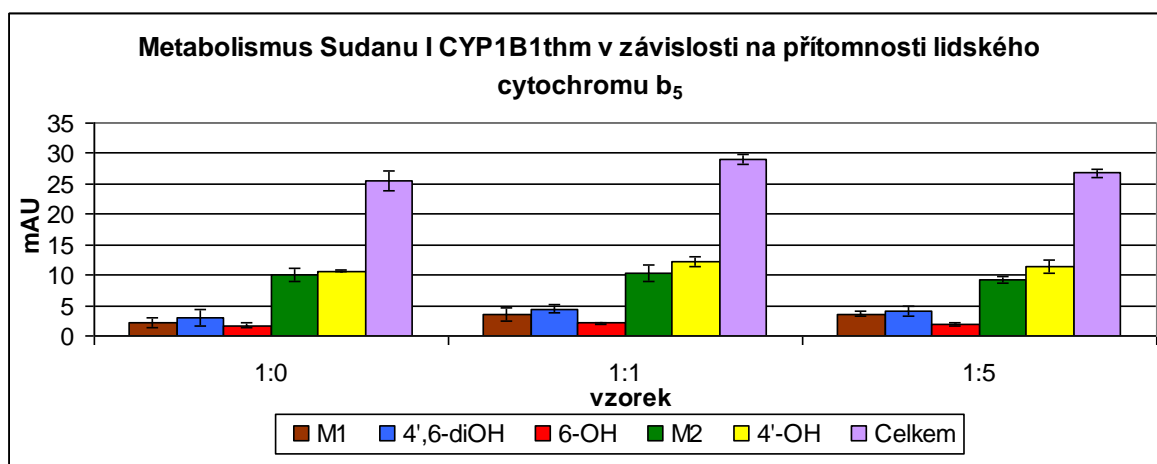
Pro každou formu lidského CYP1B1 byly připraveny tři typy rekonstituovaného systému. V prvním typu rekonstituovaného systému nebyla přítomna membránová forma lidského cytochromu b_5 , v druhém byl cytochrom P450 1B1 přítomen vzhledem k cytochromu b_5 v poměru 1:1 a ve třetím typu v poměru 1:5. Všechny popsané typy rekonstituovaného systému byly z důvodu minimalizace chyby měření připraveny ve třech paralelních experimentech. Metabolity získané reakcí rekonstituovaného systému se Sudanem I byly stanoveny pomocí HPLC. Množství metabolitů tvořených různými formami CYP1B1 jsou ukázána níže (Obrázek 29, Obrázek 30 a Obrázek 31).



Obrázek 29 Výsledky stanovení metabolitů Sudanu I z rekonstituovaného systému s cytochromem P450 1B1 s neodštěpitelnou histidinovou kotvou. Modrý sloupec odpovídá 4',6-dihydroxy Sudanu I, červený sloupec 6-hydroxy Sudanu I, zelený sloupec neznámému metabolitu 2 Sudanu I a žlutý sloupec 4'-hydroxy Sudanu I. Fialový sloupec odpovídá celkovému součtu ploch všech metabolitů.



Obrázek 30 Výsledky stanovení metabolitů Sudanu I z rekonstituovaného systému s cytochromem P450 1B1 s odštěpenou histidinovou kotvou. Modrý sloupec odpovídá 4',6-dihydroxy Sudanu I, červený sloupec 6-hydroxy Sudanu I, zelený sloupec neznámému metabolitu2 Sudanu I a žlutý sloupec 4'-hydroxy Sudanu I. Fialový sloupec odpovídá celkovému součtu ploch všech metabolitů.



Obrázek 31 Výsledky stanovení metabolitů Sudanu I z rekonstituovaného systému s cytochromem P450 1B1 s odštěpitelnou histidinovou kotvou. Hnědý sloupec odpovídá neznámému metabolitu1 Sudanu I, modrý sloupec 4',6-dihydroxy Sudanu I, červený sloupec 6-hydroxy Sudanu I, zelený sloupec neznámému metabolitu2 Sudanu I a žlutý sloupec 4'-hydroxy Sudanu I. Fialový sloupec odpovídá celkovému součtu ploch všech metabolitů.

Při porovnání celkových množství metabolitů je patrné, že forma cytochromu P450 1B1 s neodštěpitelnou histidinovou kotvou je přibližně 5x aktivnější než forma s odštěpenou kotvou, nejdelší forma CYP1B1 – s odštěpitelnou histidinovou kotvou je dokonce aktivnější přibližně 15x méně. Zajímavé ovšem je, že pokles tvorby jednotlivých metabolitů není u všech typů rekonstituovaného systému stejný. Nejvíce klesá tvorba

hlavního metabolitu 4'-hydroxy derivátu Sudanu I, zatímco tvorba 6-hydroxy derivátu klesá jen málo. Kromě toho dochází ke zvýšené tvorbě blíže neidentifikovaného metabolitu (M2), v případě nejdelší formy je dokonce pozorováno zvýšené množství druhého neznámého metabolitu (M1).

Aktivita rekonstituovaného systému s cytochromem P450 1B1 s neodštěpitelnou kotvou (Obrázek 29) po přidání lidského cytochromu b₅ roste, tento růst však je poměrně malý. Při jeho nadbytku (poměr 1:5) již neroste tak prudce jako při poměru 1:1. U 4'-hydroxy Sudanu I dokonce mírně klesá. Z grafů je rovněž patrné, že poměrové zastoupení jednotlivých metabolitů napříč třemi paralelními stanoveními se nikterak signifikantně neliší. To samé platí také o poměru metabolitů v jednotlivých třech paralelních stanoveních.

Aktivita rekonstituovaného systému obsahující cytochrom P450 1B1 s odštěpenou histidinovou kotvou (Obrázek 30) se po přidání lidského cytochromu b₅ mění jen nepatrně, její vliv tudíž není signifikantní. Aktivita rekonstituovaného systému obsahující cytochrom P450 1B1 s odštěpitelnou histidinovou kotvou (Obrázek 31) se po přidání lidského cytochromu b₅ mění opět jen nepatrně.

5 Diskuse

Tato práce navazuje na můj bakalářský projekt, v rámci kterého měly být připraveny dva lišící se konstrukty pro heterologní expresi lidského cytochromu P450 1B1. První konstrukt měl obsahovat insert kódující lidský cytochrom P450 1B1 bez jakýchkoli modifikací či přidáných kotev. Druhý insert, jež měl být vložen do stejného expresního vektoru, byl totožný s insertem kódujícím lidský cytochrom P450 1B1 rozšířený o histidinovou kotvu a za ní následující štěpící místo pro proteasu (faktor Xa) na svém 5'-konci. U obou insertů byla provedena optimalizace genového kódu bránící vzniku vlásenek.

V rámci mého bakalářského projektu byl z buněčného kmene DH5 α gramnegativní bakterie *Escherichia coli* izolován plasmid pOTB7 nesoucí gen pro lidský cytochrom P450 1B1. U získaného plasmidu byla stanovena jeho koncentrace a plasmid byl poté uložen v -80 °C. Tento plasmid byl v tomto navazujícím magisterském projektu použit jako výchozí bod práce. Gen kódující cytochrom P450 1B1 byl do plasmidu pOTB7 vložen pomocí klonovací technologie Gateway firmy Life Technologies. Kvůli následnému vkládání genu do expresního plasmidu bylo proto gen při jeho amplifikaci potřeba upravit.

V diplomovém projektu navazujícího magisterského studia byl gen, kódující lidský cytochrom P450 1B1 obsažený v plasmidu pOTB7 izolovaném již v rámci mé bakalářské práce, modifikován jiným způsobem a amplifikován pomocí metody PCR. Modifikace spočívaly v delecí 2. až 4. kodónu, optimalizaci kodónů 5 až 10 na 5'-konci genu za účelem vyšší exprese proteinu, v přidání štěpících míst pro restriční endonukleasy na oba konce genu a ve vložení úseku kódujícího histidinovou kotvu na 3'-konec genu. Druhá varianta úprav genu zahrnovala vedle již zmíněných modifikací také úsek kódující štěpící místo pro TEV proteasu, jenž byl vložen před úsek kódující histidinovou kotvu.

Oproti dřívějšímu postupu, kdy byla k purifikaci PCR reakční směsi používána metoda isopropanolového srážení, byla nyní zavedena purifikace pomocí komerčního kitu. Tato změna byla provedena z důvodu zvýšení výtěžku DNA používané pro restriční štěpení a následnou ligaci. Výtěžek dalšího kroku – izolace DNA z agarosového gelu, byl dále zvýšen použitím agarosy s nízkým bodem tání. Samotná izolace DNA z agarosového gelu pak byla prováděna metodou založenou na fenol-chloroformové extrakci s následným srážením DNA. Touto metodou byla nahrazena klasická izolace pomocí komerčního kitu.

Další změnou oproti Bc. práci je, že upravený gen byl vložen do expresního vektoru (pCW) se „slabším“ promotorem. Vzniklé konstrukty byly verifikovány nejprve pomocí agarosové elektroforesy. Oba konstrukty byly štěpeny endonukleasami, jimiž byly inserty do plasmidu pCW ligovány, a jednou specifickou endonukleasou, jejíž štěpící místo je obsaženo pouze v insertu. Po tomto primárním ověření byly oba konstrukty odeslány na verifikaci pomocí sekvenační reakce. Ověřené konstrukty byly opětovně transformovány do buněčného kmene DH5 α . Z narostlé kultury byly izolovány oba konstrukty a připraveny zásobní glycerolové kultury.

Před expresí proteinu ve větším množství media bylo přistoupeno nejprve k testovací expresi. Oba konstrukty byly nejprve transformovány do buněčných kmenů DH5 α a XL10 gold, u kterých byla po dobu 48 h porovnávána úroveň exprese cytochromu P450 1B1. Z porovnání exprimovaného množství obou forem proteinu v obou buněčných kmenech vyšel pro expresi ve větším množství media lépe kmen DH5 α , který byl pro expresi použit.

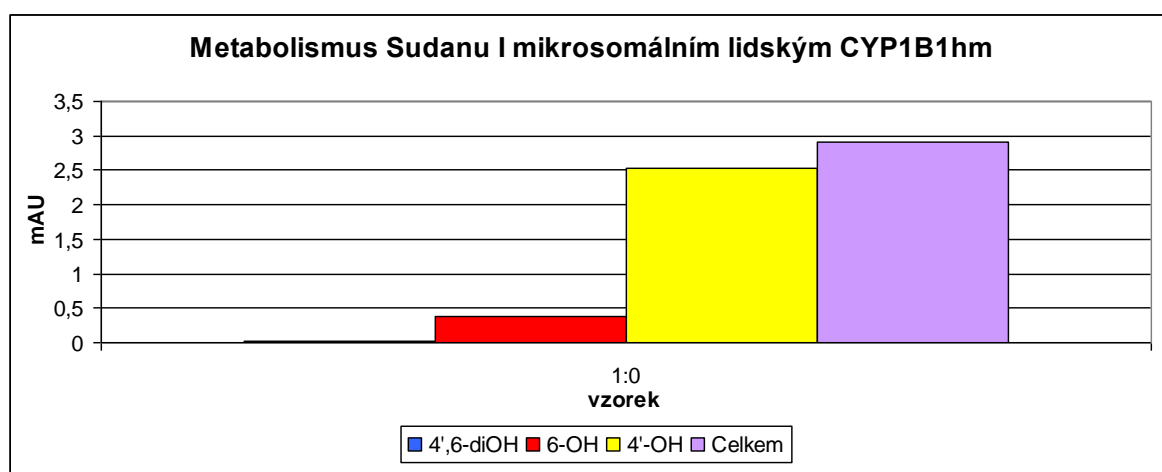
Při expresi ve větším množství media probíhala exprese CYP1B1 s odštěpitelnou histidinovou kotvou 7x rychleji, než u formy s neodštěpitelnou kotvou. Toto pozorování je možné vysvětlit faktem, že CYP1B1 s klasickou neodštěpitelnou afinitní kotvou může být pro bakterii toxičtější.

Efektivita štěpení TEV proteasou byla poměrně nízká, dle Obrázek 24 byl výtěžek menší než 20%. Během izolace bylo také zjištěno, že studované proteiny jsou poměrně špatně rozpustné ve vodném prostředí. Je tedy potřeba dbát na to, aby při zahušťování nebyla koncentrace proteinu vyšší než 5 μ M.

Specifický obsah cytochromu P450 1B1 ve výsledném preparátu štěpeném TEV proteasou byl oproti formě s neodštěpitelnou histidinovou kotvou dvojnásobný. To může souviset s vyšším počtem purifikačních kroků, které byly v případě prvně zmiňovaného preparátu použity.

Cytochrom P450 1B1 s rozpoznávací sekvencí pro TEV proteasu na C- konci má oproti proteinu s klasickou histidinovou kotvou 5x nižší aktivitu, což naznačuje, že aminokyselinová sekvence C- konce má vliv na aktivitu CYP1B1. Tento vliv se pak prohlubuje s rostoucí délkou C- konce. Neštěpená forma má tudíž aktivitu přibližně 15x nižší. Rozdíly v aktivitě různých preparátů jsou navíc provázány i rozdíly v tvorbách jednotlivých metabolitů. Byly dokonce pozorovány 1 až 2 nové metabolity. Je tedy možné,

že C-terminální modifikace vykazuje významný vliv na strukturu, popř. dynamiku lidského cytochromu P450 1B1 a je potřeba jí věnovat pozornost. Žádný ze zde izolovaných enzymů však není identický s přirozenou formou lidského CYP1B1. Pro porovnání tedy byla použita starší data o přeměně Sudanu I CYP1B1 exprimovaným v mikrosomech hmyzích buněk transfekovaných bakuloviry (Obrázek 32) [128]. Vzhledem rozdílným aktivitám preparátů nebylo možné porovnat přímo množství metabolitů, avšak poměr hlavních metabolitů 4'-hydroxy/6-hydroxy derivátů Sudanu I je nejbližší formě proteinu s neodštěpitelnou histidinovou kotvou.



Obrázek 32 Výsledky stanovení metabolitů Sudanu I z rekonstituovaného systému obsahujícího mikrosomální formu lidského cytochromu P450 1B1 a potkaní NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu. Modrý sloupec odpovídá 4',6-dihydroxy Sudanu I, červený sloupec 6-hydroxy Sudanu I a žlutý sloupec 4'-hydroxy Sudanu I. Fialový sloupec odpovídá celkovému součtu ploch všech metabolitů. Převzato z [128].

Jak již bylo zmíněno ve výsledcích, vliv cytochromu b₅ na reakci katalyzovanou CYP1B1 je jen velmi mírně stimulační a vzhledem k chybě měření nemůže být u preparátu s odštěpenou kotvou považován za signifikantní.

6 Závěr

Tato práce popisuje přípravu rekombinantního lidského cytochromu P450 1B1 pomocí heterologní exprese v bakterii *Escherichia coli*. Cíle vytyčené z počátku práce se podařilo naplnit, hlavní výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Byly změněny metody pro purifikaci PCR reakční směsi a izolace DNA z agarosového gelu používané při práci na mém bakalářském projektu. Tyto kroky se během práce na bakalářském projektu ukázaly jako problémové, jelikož při nich docházelo k signifikantním ztrátám vzorku, v jejichž důsledku se pak nedařilo připravit cílený konstrukt. Na základě těchto obměn se podařilo úspěšně připravit požadované konstrukty pro heterologní expresi cytochromu P450 1B1 s klasickou (neodštěpitelnou) histidinovou kotvou a varianty s histidinovou kotvou odštěpitelnou pomocí TEV proteasy, v obou případech na C- konci proteinu.
2. Během testovací exprese bylo zjištěno, že obě formy cytochromu P450 1B1 se exprimují v buněčném kmeni *E. coli* DH5 α o mnoho lépe než v kmeni XL10 gold. Pro expresi ve větším množství media byl proto použit kmen DH5 α .
3. Obě formy aktivního proteinu byly úspěšně izolovány a purifikovány pomocí niklové afinitní chromatografie. U formy s odštěpitelnou histidinovou kotvou bylo úspěšně provedeno její odštěpení. Tento dodatečný purifikační krok způsobil větší ztrátu proteinu, avšak získané množství proteinu postačovalo pro jeho následnou charakterizaci. Byla také izolována forma s odštěpitelnou histidinovou kotvou, u které však štěpení nebylo provedeno, tato forma s nejvíce prodlouženým C-koncem byla ponechána pro další porovnání vlivu délky této kotvy.
4. Všechny tři formy připraveného cytochromu P450 1B1 byly rekonstituovány s lipidy a potkaním NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou. Následně byla porovnána jejich aktivita v závislosti na fakultativní přítomnosti lidského cytochromu b₅. Bylo zjištěno, že rekonstituovaný systém s cytochromem P450 1B1 s neodštěpitelnou

histidinovou kotvou je přibližně pětikrát aktivnější než rekonstituovaný systém s cytochromem P450 1B1 s odštěpenou histidinovou kotvou. V preparátu s nejdelší C- koncovou modifikací byla aktivita vůči Sudanu I vzhledem ke štěpené formě CYP1B1 méně než poloviční. Vliv typu C- koncové modifikace na poměr hlavních metabolitů (4'-hydroxy/6-hydroxy) je tudíž malý. Nicméně ve všech případech byl pozorován výskyt neznámého metabolitu, v případě formy s neodštěpenou kotvou byl pozorován výskyt dvou neznámých metabolitů Sudanu I. Množství neznámého metabolitu přítomného v metabolitech všech typů rekonstituovaných systémů bylo největší v případě nejdelší modifikace C- konce.

7 Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. listy* **94**, 913-918.
2. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. JR, Martínek, V., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. listy* **98**, 876-890.
3. Stiborová, M. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. URL: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> [Viděno Duben 5, 2015].
4. Robert A. (2003) Weinberg: One Renegade Cell: How cancer begins. (Academia).
5. Stiborová, M. (2002) Aromatické nitrosloučeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. listy* **96**, 784-791.
6. Lamb, D.C., Lei, L., Warrilow, A.G.S., Lepesheva, G.I., Mullins, J.G.L., Waterman, M.R., Kelly, S.L. (2009) The First Virally Encoded Cytochrome P450. *J. Virol.* **83**, 8266–69.
7. Liska, D.J. (1998) The detoxification enzyme systems. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **3**, 187–98.
8. Jakoby, W.B., Ziegler, D.M. (1990) The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* **265**, 20715–18.
9. Xia, X.-L., Fa, B.-T., Cong, S., Wang, J.-F., Chou, K.-C. (2014) Research/Review: Insights into the Mutation-Induced Dysfunction of Arachidonic Acid Metabolism from Modeling of Human CYP2J2. *Curr. Drug Metab.* **15**, 502–13.
10. Walkowska, A., Thumová, M., Škaroupková, P., Husková, Z., Vaňourková, Z., Chábová, V.Č., Tesař, V., Kramer, H.J., Falck, J.R., Imig, J.D., Kompanowska-Jezierska, E., Sadowski, J., Červenka, L. (2010) Intrarenal CYP-450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of the nonclipped kidney function in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *J. Hypertens.* **28**, 582–93.

11. Hamadeh, H.K., Afshari, C.A. (2004) *Toxicogenomics: Principles and Applications* (John Wiley & Sons).
12. Williams, R.T., Millburn, P., Smith, R.L. (1965) The Influence of Enterohepatic Circulation on Toxicity of Drugs*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**, 110–24.
13. Ludmila Chromá, Martina Macková, Tomáš Macek, Václav Martínek, Marie Stiborová (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí: *Chem. listy* **95**, 212 – 222.
14. Kalgutkar, A.S., Gardner, I., Obach, R.S., Shaffer, C.L., Callegari, E., Henne, K.R., Mutlib, A.E., Dalvie, D.K., Lee, J.S., Nakai, Y., O'Donnell, J.P., Boer, J., Harriman, S.P. (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**, 161–225.
15. Stiborová, M., Frei, E., Breuer, A., Bieler, C.A., Schmeiser, H.H. (1999) Aristolactam I a metabolite of aristolochic acid I upon activation forms an adduct found in DNA of patients with Chinese herbs nephropathy. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* **51**, 421–27.
16. Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., Stiborova, M. (2006) Bioactivation of 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone: evidence for DNA adduct formation mediated by cytochrome P450 enzymes and peroxidases. *Cancer Lett.* **234**, 220–31.
17. Stiborová, M., Fernando, R.C., Schmeiser, H.H., Frei, E., Pfau, W., Wiessler, M. (1994) Characterization of DNA adducts formed by aristolochic acids in the target organ (forestomach) of rats by ³²P-postlabelling analysis using different chromatographic procedures. *Carcinogenesis* **15**, 1187–92.
18. Brown, D.R., Clark, B.W., Garner, L.V.T., Di Giulio, R.T. (2014) Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* .
19. Čapek, J., Musilová, L., Macek, T., Uhlík, O. (2014) Dioxygenasy hydrolyzující aromatické kruhy - vztah struktury a substrátové specifity. *Chem. listy* **108**, 182-190.

20. Stiborová, M., Černá, V., Moserová, M., Mrízová, I., Arlt, V.M., Frei, E. (2015) The anticancer drug ellipticine activated with cytochrome P450 mediates DNA damage determining its pharmacological efficiencies: studies with rats, Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRNTM) mice and pure enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 284–306.
21. Wohak, L.E., Kraus, A.M., Kucab, J.E., Stertmann, J., Ovrebø, S., Seidel, A., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2014) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism. *Arch. Toxicol.* .
22. Linhart, K., Bartsch, H., Seitz, H.K. (2014) The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* **3**, 56–62.
23. Niwa, T., Murayama, N., Imagawa, Y., Yamazaki, H. (2015) Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450. *Drug Metab. Rev.* , 1–22.
24. Stiborova, M., Schmeiser, H.H., Frei, E., Hodek, P., Martinek, V. (2014) Enzymes Oxidizing the Azo Dye 1-Phenylazo-2-Naphthol (Sudan I) and their Contribution to its Genotoxicity and Carcinogenicity. *Curr. Drug Metab.* **15**, 829–40.
25. Howard, P.C., Beland, F.A. (1982) Xanthine oxidase catalyzed binding of 1-nitropyrene to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 727–32.
26. De Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S., van den Anker, J.N. (1999) Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **36**, 439–52.
27. Hinchman, C.A., Ballatori, N. (1994) Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J. Toxicol. Environ. Health* **41**, 387–409.
28. Coon, M.J. (1978) Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. *Nutr. Rev.* **36**, 319–28.
29. Omura, T., Morohashi, K. (1995) Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 19–25.
30. Chen, G.M., Bray, T.M., Janzen, E.G., McCay, P.B. (1991) The role of mixed function oxidase (MFO) in the metabolism of the spin trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitrone (PBN) in rats. *Free Radic. Res. Commun.* **14**, 9–16.
31. Lee, D.L. (2003) *The Biology of Nematodes* (CRC Press).

32. Dürr, U.H.N., Waskell, L., Ramamoorthy, A. (2007) The cytochromes P450 and b5 and their reductases—Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1768**, 3235–59.
33. Strittmatter, P., Velick, S.F. (1956) The Isolation and Properties of Microsomal Cytochrome. *J. Biol. Chem.* **221**, 253–64.
34. Vergères, G., Waskell, L. (1995) Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**, 604–20.
35. Lee, K.-H., Kuczera, K. (2003) Molecular dynamics simulation studies of cytochrome b5 from outer mitochondrial and microsomal membrane. *Biopolymers* **69**, 260–69.
36. Ogishima, T., Kinoshita, J.-Y., Mitani, F., Suematsu, M., Ito, A. (2003) Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 21204–11.
37. Choury, D., Leroux, A., Kaplan, J.C. (1981) Membrane-bound cytochrome b5 reductase (methemoglobin reductase) in human erythrocytes. Study in normal and methemoglobinemic subjects. *J. Clin. Invest.* **67**, 149–55.
38. Paltuaf, F., Prough, R.A., Masters, B.S., Johnston, J.M. (1974) Evidence for the participation of cytochrome b5 in plasmalogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **249**, 2661–62.
39. Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M.J., Setlow, B., Redline, R. (1974) Purification and Properties of Rat Liver Microsomal Stearyl Coenzyme A Desaturase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 4565–69.
40. Grinstead, G.F., Gaylor, J.L. (1982) Total enzymic synthesis of cholesterol from 4,4,14 alpha-trimethyl-5 alpha-cholesta-8,24-dien-3 beta-ol. Solubilization, resolution, and reconstitution of delta 7-sterol 5-desaturase. *J. Biol. Chem.* **257**, 13937–44.
41. Porter, T.D. (2002) The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 311–16.
42. Iyanagi, T. (1977) Redox properties of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5. *Biochemistry (Mosc.)* **16**, 2725–30.
43. Nunez-Quintana, M., Truan, G., Van Heijenoort, C. (2006) Solution Structure of human cytochrome b5. *Be Publ.* , null – null.

44. Yamada, M., Tamada, T., Takeda, K., Matsumoto, F., Ohno, H., Kosugi, M., Takaba, K., Shoyama, Y., Kimura, S., Kuroki, R., Miki, K. (2013) Elucidations of the Catalytic Cycle of NADH-Cytochrome b5 Reductase by X-ray Crystallography: New Insights into Regulation of Efficient Electron Transfer. *J. Mol. Biol.* **425**, 4295–4306.
45. Yang, M.X., Cederbaum, A.I. (1994) Fractionation of liver microsomes with polyethylene glycol and purification of NADH-cytochrome b5 oxidoreductase and cytochrome b5. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 438–44.
46. Haas, E., Horecker, B.L., Hogness, T.R. (1940) The Enzymatic Reduction of Cytochrome C Cytochrome C Reductase. *J. Biol. Chem.* **136**, 747–74.
47. Lu, A.Y.H., Coon, M.J. (1968) Role of Hemoprotein P-450 in Fatty Acid ω -Hydroxylation in a Soluble Enzyme System from Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **243**, 1331–32.
48. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8411–16.
49. Vermilion, J.L., Coon, M.J. (1978) Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J. Biol. Chem.* **253**, 2694–2704.
50. Murataliev, M.B., Feyereisen, R., Walker, F.A. (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 1–26.
51. Laden, B.P., Tang, Y., Porter, T.D. (2000) Cloning, Heterologous Expression, and Enzymological Characterization of Human Squalene Monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **374**, 381–88.
52. Enoch, H.G., Strittmatter, P. (1979) Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **254**, 8976–81.
53. Xia, C., Panda, S.P., Marohnic, C.C., Martasek, P., Masters, B.S., Kim, J.J. (2011) Structural basis for human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 13486–91.
54. Axelrod, J. (1955) The enzymatic demethylation of ephedrine. *Journal of Pharmacology*, **114**, 430-8.

55. Brodie, B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, L., LaDu, B. N., Mitoma, C., Udenfried, S. (1955) Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, **121**, 603-4.
56. Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493–509.
57. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376–86.
58. Omura, T., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–78.
59. Omura, T., Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379–85.
60. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J. (1986) Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Biochemistry (Mosc.)* **25**, 5314–22.
61. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., Kraut, J. (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, 16122–30.
62. Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A., Deisenhofer, J. (1994) Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **236**, 1169–85.
63. Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasemann, C.A., Peterson, J.A., Deisenhofer, J. (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731–36.
64. Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA Mary Ann Liebert Inc* **6**, 1–11.
65. Nelson, D.R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 14–18.
66. Gunsalus, I.C., Sligar, S.G. (1978) Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **47**, 1–44.

67. Hanson, L.K., Eaton, W.A., Sligar, S.G., Gunsalus, I.C., Gouterman, M., Connell, C.R. (1976) Origin of the anomalous Soret spectra of carboxycytochrome P-450. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2672–74.
68. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–80.
69. Y HASHIMOTO, T.Y. (1963) An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J. Biol. Chem.* **237**, 3843–44.
70. Iyanagi, T., Xia, C., Kim, J.-J.P. (2012) NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: Prototypic Member of the Diflavin Reductase Family. *Arch. Biochem. Biophys.* **528**, 72–89.
71. Sutter, T.R., Guzman, K., Dold, K.M., Greenlee, W.F. (1991) Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* **254**, 415–18.
72. Sutter, T.R., Tang, Y.M., Hayes, C.L., Wo, Y.Y., Jabs, E.W., Li, X., Yin, H., Cody, C.W., Greenlee, W.F. (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **269**, 13092–99.
73. CYP1B1 - cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (2015) URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYP1B1> [Viděno duben 2, 2015].
74. Tang, Y.M., Wo, Y.Y., Stewart, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Sutter, T.R., Greenlee, W.F. (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 28324–30.
75. CYP1B1 URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1b1.htm> [Viděno duben 3, 2015].
76. Wang, A., Savas, U., Stout, C.D., Johnson, E.F. (2011) Structural characterization of the complex between alpha-naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1. *J. Biol. Chem.* **286**, 5736–43.
77. Nebert, D.W. (1991) Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **5**, 1203–14.

78. Stoilov, I., Akarsu, A.N., Sarfarazi, M. (1997) Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 641–47.
79. Berraho, A., Serrou, A., Fritez, N., El Annas, A., Bencherifa, F., Gaboun, F., Hilal, L. (2015) Genotype-phenotype correlation in moroccan patients with primary congenital glaucoma. *J. Glaucoma* **24**, 297–305.
80. Melki, R., Colomb, E., Lefort, N., Brézin, A.P., Garchon, H.-J. (2004) CYP1B1 mutations in French patients with early-onset primary open-angle glaucoma. *J. Med. Genet.* **41**, 647–51.
81. Gong, B., Qu, C., Li, X., Shi, Y., Lin, Y., Zhou, Y., Shuai, P., Yang, Y., Liu, X., Zhang, D., Yang, Z. (2015) Mutation spectrum of CYP1B1 in Chinese patients with primary open-angle glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* **99**, 425–30.
82. Bashir, R., Sanai, M., Azeem, A., Altaf, I., Saleem, F., Naz, S. (2014) Contribution of GLC3A locus to Primary Congenital Glaucoma in Pakistani population. *Pak. J. Med. Sci.* **30**, 1341–45.
83. Plásilová, M., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Kádasi, L., Feráková, E., Ferák, V. (1999) Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J. Med. Genet.* **36**, 290–94.
84. Wang, A., Savas, U., Stout, C.D., Johnson, E.F. (2010) Structural Characterization of the Complex between {alpha}-Naphthoflavone and Human Cytochrome P450 1B1. *J. Biol. Chem.* **286**, 5736–43.
85. Murray, G.I., Melvin, W.T., Greenlee, W.F., Burke, M.D. (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 297–316.
86. Ozbek, Y.K., Oztürk, T., Tüzüner, B.M., Calay, Z., Ilvan, S., Seyhan, F.M., Kisakesen, H.I., Oztürk, O., Isbir, T. (2010) Combined effect of CYP1B1 codon 432 polymorphism and N-acetyltransferase 2 slow acetylator phenotypes in relation to breast cancer in the Turkish population. *Anticancer Res.* **30**, 2885–89.

87. Ueng, Y.-F., Don, M.-J., Jan, W.-C., Wang, S.-Y., Ho, L.-K., Chen, C.-F. (2006) Oxidative metabolism of the alkaloid rutaecarpine by human cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, 821–27.
88. Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J.B. (2004) Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **32**, 840–47.
89. Chang, T.K.H., Waxman, D.J. (2006) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **320**, 85–90.
90. Shimada, T., Wunsch, R.M., Hanna, I.H., Sutter, T.R., Guengerich, F.P., Gillam, E.M. (1998) Recombinant human cytochrome P450 1B1 expression in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**, 111–20.
91. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N.E., Alworth, W.L., Guengerich, F.P. (1998) Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1048–56.
92. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979–84.
93. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. listy* **93**, 229–237.
94. Miksys, S.L., Tyndale, R.F. (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J. Psychiatry Neurosci.* **27**, 406–15.
95. Pavek, P., Dvorak, Z. (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.* **9**, 129–43.
96. Shuster, J.R. (1991) Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 685–90.
97. Hitchman, R.B., Possee, R.D., King, L.A. (2009) Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat. Biotechnol.* **3**, 46–54.

98. Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–98.
99. Edwards, J.W., Walker, E.L., Coruzzi, G.M. (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3459–63.
100. Galuszka, P. Prezentace Expresní systémy.
URL:<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/8.pdf> [Viděno srpen 10, 2015].
101. Khan, K.H. (2013) Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Adv. Pharm. Bull.* **3**, 257–63.
102. Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453–62.
103. What does the DH5alpha mean in E.coli DH5alpha bacteria - Molecular Cloning
URL: <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/7729.html> [Viděno duben 10, 2015].
104. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*.
105. Complementary DNA - Wikipedia, the free encyclopedia URL:
http://en.wikipedia.org/wiki/Complementary_DNA [Viděno duben 10, 2015].
106. Barnes, H.J. (1996) Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* **272**, 3–14.
107. Patent EP0697462A2 - Process for producing Glycine-N-Methyl Transferase using recombinant DNA - Patenty Google URL:
<http://www.google.com/patents/EP0697462A2?cl=en> [Viděno duben 10, 2015].
108. Mutoh, N., Simon, M.I. (1986) Nucleotide sequence corresponding to five chemotaxis genes in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **165**, 161–66.
109. Boer, H.A. de, Comstock, L.J., Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 21–25.

110. Wheatley, R.W., Lo, S., Jancewicz, L.J., Dugdale, M.L., Huber, R.E. (2013) Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J. Biol. Chem.* **288**, 12993–5.
111. Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J.B. (2000) Enhanced expression of CYP1B1 in Escherichia coli. *Toxicology* **144**, 211–19.
112. Shimada, T., Wunsch, R.M., Hanna, I.H., Sutter, T.R., Guengerich, F.P., Gillam, E.M.J. (1998) Recombinant Human Cytochrome P450 1B1 Expression in Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**, 111–20.
113. Sojka, P.: Příprava vektorů pro heterologní expresi lidského cytochromu P450 1B1: Bakalářská práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, (2012).
114. Milichovský, J.: Heterologní exprese a izolace lidských isoform cytochromů P450 1A1/2: Magisterská práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, (2011).
115. Sambrook, J. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York). 3rd Ed.
116. Double Digest Finder | NEB URL: <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder> [Viděno únor 3, 2015].
117. 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) | NEB URL: <https://www.neb.com/products/n3200-2-log-dna-ladder-01-100-kb> [Viděno únor 3, 2015].
118. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231–37.
119. Kim Microplate Software URL: <http://www.ok.cz/dkitt/> [Viděno únor 3, 2015].
120. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–85.
121. Weber, K., Osborn, M. (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–12.

122. PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder | Thermo Scientific URL: <http://www.thermoscientificbio.com/protein-electrophoresis/pageruler-unstained-broad-range-protein-ladder/> [Viděno únor 3, 2015].
123. Tobacco etch virus, wikipedia free encyclopedia, URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_etch_virus [Viděno duben 17, 2015].
124. TEV protease (2015) *wikipedia free encycl.*
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/TEV_protease [Viděno duben 17, 2015].
125. CYP1B1 in pOTB7
URL: <http://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetCloneDetail.do?cloneid=332103&species> [Viděno únor 3, 2015].
126. Ensembl genome browser 78: Homo sapiens - Population genetics - rs1056836 (SNP)
URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:38070560-38071560;v=rs1056836;vdb=variation;vf=870162 [Viděno únor 3, 2015].
127. Gasteiger, E., Hoogland, Ch., Gattiker, A., Davaud, S., Wilkins, M. R., Apple, R. D., Bairoch, A. (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*, (Humana Press).
128. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I Is a Potential Carcinogen for Humans Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678–84.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
--------------------------	----------	-----------------	----------